

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Química e Bioquímica



**Estudo dos extractos biologicamente activos de  
*Salvia sclareoides* Brot. e de  
*Asteriscus vogelii* (Webb.) Walp. e pesquisa dos  
seus princípios activos**

Isabel Maria Martins Horta Branco

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA

(Química Orgânica)

Tese orientada por:

Professora Doutora Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter

2010



*A meus pais e irmã*



## AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer à minha orientadora Professora Doutora Amélia Pilar Rauter, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, o apoio incondicional e a amizade que sempre me concedeu e sem os quais teria sido impossível concluir este trabalho.

Ao Doutor Jaime Bermejo Barrera agradeço a orientação científica durante o estágio realizado no Instituto de Productos Naturales y Organicos da Universidade de La Laguna, Tenerife, Espanha. Agradeço também a simpatia e a amizade que sempre demonstrou e que muito contribuíram para tornar a minha estadia mais agradável.

Quero expressar o meu agradecimento ao Doutor Karl Keys, da Estação de Investigação Agrícola da BASF, Limburgerhof, Alemanha, por ter autorizado a realização do estágio nos laboratórios da empresa.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Justino, do Instituto Politécnico de Santarém, por ter proporcionado a realização de testes de actividade biológica que muito valorizaram uma das plantas em estudo.

Desejo agradecer à Doutora Margarida Goulart, do Instituto Politécnico de Santarém, por ter efectuado os testes de toxicidade, e à Doutora Filipa Vinagre, do mesmo Instituto, pela realização dos testes de actividade anticolinesterásica e antioxidante e pela determinação do conteúdo fenólico de *Salvia sclareoides*.

Ao Dr. Nuno Neng, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências agradeço a realização das análises de HPLC-DAD.

Expresso o meu agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia pela bolsa de doutoramento concedida e pelo financiamento dos estágios e das deslocações a congressos internacionais.

A todos os colegas dos diversos laboratórios onde trabalhei agradeço a simpatia e a colaboração dispensadas. Quero deixar uma referência especial à Doutora Alice Martins que, durante a fase final deste percurso, teve sempre uma palavra de apoio e uma disponibilidade inesgotável para me ajudar nos momentos menos fáceis.

Desejo ainda agradecer à minha amiga Isabel pelo incentivo permanente que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho.

Finalmente agradeço à minha família por ter estado sempre presente.

A todos,

Muito obrigada.

## RESUMO

O género *Salvia* inclui mais de 900 espécies que fazem parte da flora endémica de várias regiões do mundo e é conhecido desde a Antiguidade pelas suas propriedades medicinais. Na Europa, a espécie *Salvia officinalis* L. (salva) é usada há séculos para diferentes fins, entre os quais o tratamento da demência e a melhoria da memória. Neste trabalho descrevem-se os constituintes maioritários e a actividade biológica dos extractos da parte aérea de *Salvia sclareoides* Brot., uma espécie endémica da Península Ibérica. O estudo fitoquímico da planta permitiu o isolamento de um novo composto, o 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol, e de ácido ursólico, 1 $\beta$ ,2 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol, nepeticina, nepetidina, 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, hederagenina e ácido sumaresinólico. Os cinco últimos compostos foram identificados nesta planta pela primeira vez enquanto a nepetidina e o ácido sumaresinólico são novos em espécies de *Salvia*. O conteúdo total de fenóis foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. A análise dos extractos por HPLC-DAD permitiu identificar diversos ácidos fenólicos e os flavonóides rutina, quercitina, *O*-glucósido de canferol e catequina. Investigou-se actividade fitotóxica, insecticida e antifúngica do extracto em acetona que inibiu significativamente o crescimento de *Botrytis cinerea* e *Erisiphe graminis* (85-95%) embora não tenha revelado qualquer efeito fitotóxico ou insecticida. Tendo em vista a avaliação do seu potencial medicinal, procedeu-se ao estudo da actividade anticolinesterásica de vários extractos desta planta, usando acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, enzimas que têm um papel crucial no desenvolvimento da doença de Alzheimer. Verificou-se que alguns extractos, com a concentração de 1000  $\mu$ g/mL, inibem completamente as duas enzimas e que, à concentração de 10  $\mu$ g/mL, ainda se regista inibição enzimática, contrariamente ao que acontece com a rivastigmina, medicamento usado no tratamento da doença de Alzheimer, que não tem qualquer acção na acetilcolinesterase, com esta concentração.

A actividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, sendo mais eficiente o extracto em butanol ( $IC_{50}$  7,9  $\mu$ g/mL, DPPH). Os testes de toxicidade efectuados, utilizando células de leucemia humana K562 (viabilidade celular) e linfócitos humanos (genotoxicidade), não revelaram qualquer toxicidade dos extractos. Os resultados do trabalho agora apresentados sugerem que *S. sclareoides* poderá ser usada como alimento funcional e que se deve prosseguir a investigação do seu potencial no âmbito da prevenção e tratamento da doença de Alzheimer.

As lactonas sesquiterpénicas possuem uma apreciável diversidade de actividades biológicas, nomeadamente, propriedades antitumorais. O presente trabalho reporta os resultados do estudo fitoquímico das fracções biologicamente activas resultantes do fraccionamento do extracto em clorofórmio de *Asteriscus vogelii* (Webb.) Walp. que permitiram o isolamento de um composto novo, a (2*Z*)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida, das asteriscunolidas A, C e D e dos ácidos (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico, (2*Z*,6*E*,9*Z*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico e (2*Z*,6*E*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico, caracterizados na forma dos respectivos ésteres metílicos. O estudo da actividade fitotóxica revelou uma actividade significativa das asteriscunolidas C e D em culturas de *Lemna paucicostata* (lentilha-d'água). O estudo da actividade citotóxica em linhas celulares P-388 (linfoma de ratinhos), A-549 (carcinoma do pulmão humano) e MEL-28 (melanoma humano) e HT-29 (carcinoma do cólon humano) evidenciou bons resultados, particularmente, para as asteriscunolidas A, C e D com valores de  $IC_{50}$  inferiores aos da cisplatina usada no tratamento do cancro.



## **PALAVRAS-CHAVE**

*Salvia sclareoides*; (1 $\beta$ ,3 $\beta$ )-lup-20(29)-ene-1,3,30-triol; Actividade biológica;  
*Asteriscus vogelii*; (2*Z*)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida;  
Citotoxicidade.



## ABSTRACT

*Salvia* species are widespread in nature and used in traditional medicine since ancient times. In Europe *Salvia officinalis* L. (sage) is a remedy to treat dementia and enhance memory. Herein we report on constituents and biological activity of the aerial parts of *Salvia sclareoides* Brot., an endemic species to the Iberian Peninsula. The phytochemical study of the plant afforded the new lupene triterpenetriol (1 $\beta$ ,3 $\beta$ )-lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (1 $\beta$ ,11 $\alpha$ )-dihydroxy-lup-20(29)-en-3-one, hederagenin, nepeticin, nepetidin and sumaresinolic acid were isolated from this *Salvia* sp. for the first time, while the latter two compounds are new in *Salvia* spp. Ursolic acid and lupendiol were also obtained. The total phenolics content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the chemical analysis by HPLC-DAD afforded the plant phenolic profile containing phenolic acids and the flavonoids rutin, kaempferol-*O*-glucoside, quercetin and catechin. Phytotoxic, antifungal and insecticidal activities were evaluated and the acetone extract inhibited the growth of *Botrytis cinerea* and *Erisiphe graminis* (85-95%), while no phytotoxicity or insecticidal activity were detected. The plant was also screened for its medicinal potential and the effects of various extracts on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, which play a role in the Alzheimer's disease, were examined *in vitro* using the Ellman's method. Both enzymes were inhibited completely at 1000  $\mu$ g/mL and at lower concentrations, all extracts inhibited acetylcholinesterase, even at 10  $\mu$ g/mL, while rivastigmine did not inhibit the enzyme at this concentration. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical scavenging and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays and the butanol extract was the most effective one (IC<sub>50</sub> 7.9  $\mu$ g/mL, DPPH). Toxicity studies of the extracts using human immortalized leukemia cells (acute toxicity) and human blood lymphocytes (genotoxicity) indicated that no acute toxicity nor evidence of genotoxicity risk were observed. The presented results suggest that *S. sclareoides* and components could be useful for nutraceutical purposes and merit further investigation for the treatment and prevention of Alzheimer's disease.

Sesquiterpene lactones have attracted the attention of chemists because they possess a large number of bioactivities, namely, antitumor properties. This work reports on the bioguided phytochemical study of the chloroform extract of *Asteriscus vogelii*, which afforded the new humulenolide (2*Z*)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olide, asteriscunolides A, C, D, and (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oic, (2*Z*,6*E*,9*Z*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oic and (2*Z*,6*E*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oic acids, characterised as their methyl esters. Evaluation of their phytotoxic activity showed that asteriscunolides C and D were the most potent ones for plant cell cultures and the plant *Lemna paucicostata*. However the most promising results were the cytotoxic activities against P-338 lymphoma in mice, A-549 carcinoma of human lung, HT-29 carcinoma of human colon and MEL-28 human melanoma. The IC<sub>50</sub> values for the growth inhibition of those cell lines promoted by asteriscunolides A, C and D were even smaller than those for cisplatin, well-known for its potent antitumor activity. As a conclusion, the first phytochemical study of this plant species and also the first investigation of its cytotoxic activities led to the identification of asteriscunolides A, C and D as new leads for antitumor agents, competing well with cisplatin, a drug in the market against cancer.

## KEYWORDS

*Salvia sclareoides*; (1 $\beta$ ,3 $\beta$ )-Lup-20(29)-ene-1,3,30-triol; Bioactivity; *Asteriscus vogelii*; 8-oxo-6,7,9,10-tetrahydrohumulen-1,12-olide; Cytotoxicity.



## ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico

ABTS – Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AChE – Acetilcolinesterase

ATChI – Iodeto de acetiltiocolina (*acetylthiocholine iodide*)

BChE – Butirilcolinesterase

BTChI – Iodeto de *S*-butiriltiocolina (*S-butyrilthiocholine iodide*)

BHT – Hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene*)

CCF<sub>an.</sub> – Cromatografia em camada fina analítica

CCF<sub>prep.</sub> – Cromatografia em camada fina preparativa

CLC – Cromatografia Líquida em Coluna

COSY – *Correlation spectroscopy*

CUPRAC - *Cupric reducing antioxidant capacity*

δ – Desvio químico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (*5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid*)

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

*d* – dubleto

*dd* – dubleto duplo

EIMS – Espectrometria de massa de impacto electrónico (*electron impact mass spectrometry*)

EMEM – Meio mínimo essencial de Eagle (*Eagle's minimum essential medium*)

Et<sub>2</sub>O – Éter dietílico

EtOAc – Acetato de etilo

EtOH – Etanol

FCS – Soro fetal de bovino (*fetal calf serum*)

FRAP – *Ferric reducing antioxidant power*

GA – Ácido gálico (*gallic acid*)

GAE – Equivalentes em ácido gálico (*gallic acid equivalents*)

Glc - Glucosil

HMBC – *Heteronuclear multiple bond correlation*

HMQC – *Heteronuclear multiple quantum correlation*

HPLC – DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de vector  
de díodos (*high performance liquid chromatography - diod  
array detector*)

HRMS – Espectrometria de massa de alta resolução (*high resolution impact  
mass spectrometry*)

IC<sub>50</sub> – Concentração para a qual se verifica 50% de inibição

IV – Infravermelho

*J* – Constante de acoplamento

lit. – Literatura

M<sup>+</sup> – Íão molecular

*m* – Multiplete

Me – Metilo

MeOH – Metanol

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio [*3-(4,5-  
dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]



$m/z$  – Razão massa/carga

neaa – Aminoácidos não-essenciais (*non-essential aminoacids*)

Me<sub>2</sub>CO – Acetona (propanona)

NOESY – *Nuclear overhauser effect spectroscopy*

$p$  – Grau de significância

*p.a.* – *pro analisis*

p.f. – Ponto de fusão

ppm – Partes por milhão

PhH – Benzeno

<sup>13</sup>C NMR – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

<sup>1</sup>H NMR – Ressonância Magnética Nuclear de Protão

Rt – Tempo de retenção (*retention time*)

$s$  – Singleto

sin. – Sinónimo

sps. – Espécies

subsp. – Subespécie

$t$  – tripleto

TLV – Limite máximo de exposição (*threshold limit value*)

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

var. – Variedade



## ÍNDICES



## ÍNDICE GERAL

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1 Género <i>Salvia</i> - Generalidades .....	3
1.2 Actividades biológicas de <i>Salvia</i> .....	5
1.2.1 Acção antioxidante .....	6
1.2.2. Acção anti-inflamatória .....	12
1.2.3 Acção antimicrobiana .....	13
1.2.4 Acção antitumoral .....	17
1.2.5 Acção no sistema nervoso .....	20
1.3 <i>Salvia sclareoides</i> Brot. ....	26
1.4 O género <i>Asteriscus</i> .....	27
<b>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
2.1 Introdução .....	35
2.2 Fitoquímica e actividade biológica de <i>S. sclareoides</i> .....	37
2.2.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados do extracto em acetona .....	37
2.2.1.1 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol ( <b>52</b> ) .....	39
2.2.1.2 Nepetidina [1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-1,3,11-triol, <b>53</b> ] .....	42
2.2.1.3 Nepeticina [3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-3,11-diol , <b>54</b> ] .....	44
2.2.1.4 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol ( <b>55</b> ) .....	46
2.2.1.5 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona ( <b>56</b> ) .....	47
2.2.1.6 Ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-óico, <b>22</b> ) .....	48
2.2.1.7 Ácido sumaresinólico (ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -di-hidroxiolean-12-en-28-óico, <b>57</b> ) .....	50
2.2.1.8 Hederagenina (ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroxiolean-12-en-28-óico, <b>58</b> ) .....	52
2.2.2 Determinação do conteúdo em fenóis .....	53
2.2.3 Actividade biológica .....	57
2.2.3.1 Actividade fitotóxica .....	57
2.2.3.2 Actividade antifúngica .....	57
2.2.3.3 Actividade insecticida .....	57
2.2.3.4 Actividade anticolinesterásica .....	57

2.2.3.5 Actividade antioxidante .....	61
2.2.3.6 Testes de toxicidade .....	64
2.3 Avaliação da bioactividade e estudo fitoquímico de <i>A. vogelii</i> . Pesquisa dos princípios activos.....	66
2.3.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados do extracto em clorofórmio .....	66
2.3.1.1 (2 <i>Z</i> )-8-Oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida ( <b>70</b> ) .....	68
2.3.1.2 Asteriscunolida A ( <b>32</b> ).....	70
2.3.1.3 Asteriscunolida C ( <b>34</b> ).....	71
2.3.1.4 Asteriscunolida D ( <b>35</b> ) .....	72
2.3.1.5 (2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> ,9 <i>E</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>36a</b> ) .....	73
2.3.1.6 (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>Z</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>37a</b> ) .....	75
2.3.1.7 (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>E</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>38a</b> ) .....	76
2.3.2 Actividade biológica .....	77
2.3.2.1 Actividade fitotóxica .....	77
2.3.2.2 Actividade antifúngica .....	79
2.3.2.3 Actividade insecticida .....	80
2.3.2.4 Actividade biológica dos compostos isolados.....	80
2.4 Conclusões finais .....	82
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>87</b>
3.1 Materiais e métodos.....	87
3.1.1 Cromatografia .....	87
3.1.1.1 Solventes para cromatografia .....	87
3.1.1.2 Sílica e placas para cromatografia .....	87
3.1.2 Observação dos cromatogramas .....	87
3.1.3 HPLC – DAD .....	88
3.1.4 Pontos de fusão.....	88
3.1.5 Espectroscopia .....	88
3.1.5.1 Ressonância Magnética Nuclear .....	88
3.1.5.2 Infravermelho.....	89
3.1.5.3 Ultravioleta/luz visível.....	89
3.1.6 Espectrometria de Massa.....	89

3.1.7	Preparação dos extractos .....	89
3.1.7.1	Extractos de <i>S. sclareoides</i> .....	89
3.1.7.1.1	Preparação do extracto em Me <sub>2</sub> CO .....	90
3.1.7.1.2	Preparação do extracto em EtOH .....	90
3.1.7.1.3	Preparação dos extractos em CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , MeOH, BuOH e água .....	90
3.1.7.2	Extractos de <i>A. vogelii</i> .....	91
3.1.8	Fraccionamento dos extractos e fracções .....	91
3.1.8.1	<i>S. sclareoides</i> .....	91
3.1.8.1.1	Extracto em Me <sub>2</sub> CO .....	91
3.1.8.1.2	Fracção A .....	91
3.1.8.1.3	Fracção B .....	92
3.1.8.1.4	Fracção C .....	92
3.1.8.1.5	Fracção D .....	93
3.1.8.1.6	Fracção E .....	93
3.1.8.2	<i>A. vogelii</i> .....	93
3.1.8.2.1	Fracção (F+G) .....	93
3.1.8.2.2	Fracção I+J .....	94
3.1.8.2.3	Fracção P .....	94
3.1.8.2.4	Fraccionamento do segundo extracto .....	95
3.1.9	Metilação das fracções .....	95
3.1.9.1	Preparação do diazometano .....	95
3.1.9.2	Procedimento .....	95
3.1.10	Determinação do conteúdo em compostos fenólicos .....	96
3.1.10.1	Método de Folin-Ciocalteu .....	96
3.1.10.1.1	Soluções para o traçado da curva de calibração .....	96
3.1.10.1.2	Realização do ensaio .....	96
3.1.10.1.3	Cálculo do conteúdo total de fenóis .....	96
3.1.10.2	HPLC – DAD .....	97
3.1.10.2.1	Reagentes e padrões .....	97
3.1.10.2.3	Preparação das amostras e dos padrões .....	97
3.1.10.2.3	Condições da análise .....	97
3.1.11	Actividade biológica .....	98

3.1.11.1 Actividade fitotóxica – 1ª Fase .....	98
3.1.11.2 Actividade fitotóxica – 2ª Fase .....	98
3.1.11.2.1 Testes com <i>Lemna paucicostata</i> .....	98
3.1.11.2.2 Testes com <i>Azolla filiculoides</i> .....	99
3.1.11.2.3 Testes com <i>Sinapis alba</i> .....	99
3.1.11.2.4 Testes com <i>Scenedesmus acutus</i> .....	99
3.1.11.3 Actividade antifúngica .....	100
3.1.11.4 Actividade insecticida .....	101
3.1.11.4.1 Testes com <i>Prodenia litura</i> .....	101
3.1.11.4.2 Testes com <i>Aphis fabae</i> .....	101
3.1.11.4.3 Testes com <i>Plutella maculipennis</i> .....	101
3.1.11.5 Actividade anticolinesterásica.....	102
3.1.11.5.1 Enzimas e Reagentes.....	102
3.1.11.5.2 Preparação das soluções.....	102
3.1.11.5.3 Realização dos ensaios com AChE e BChE.....	103
3.1.11.5.4 Cálculo da inibição enzimática .....	103
3.1.11.5.5 Análise estatística dos dados.....	104
3.1.11.6 Actividade antioxidante.....	104
3.1.11.6.1 Reagentes .....	104
3.1.11.6.2 Ensaio pelo método de DPPH .....	104
3.1.11.6.2.1 Soluções de extractos .....	104
3.1.11.6.2.2 Solução de DPPH.....	104
3.1.11.6.2.3 Realização do ensaio .....	105
3.1.11.6.2.4 Cálculo da actividade antioxidante .....	105
3.1.11.6.3 Ensaio pelo método $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	105
3.1.11.6.3.1 Soluções de extractos .....	106
3.1.11.6.3.2 Solução de $\beta$ -caroteno/ácido linoleico .....	106
3.1.11.6.3.3 Realização do ensaio .....	106
3.1.11.6.3.4 Cálculo da actividade antioxidante .....	107
3.1.11.7 Testes de toxicidade.....	107
3.1.11.7.1 Toxicidade aguda .....	107
3.1.11.7.2 Genotoxicidade .....	108



3.1.11.8 Actividade antitumoral.....	108
3.2 Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados.....	110
3.2.1 <i>S. sclareoides</i> .....	110
3.2.1.1 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol ( <b>70</b> ).....	110
3.2.1.2 Nepetidina [1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-1,3,11-triol, <b>53</b> ] .....	111
3.2.1.3 Nepeticina [3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-3,11-diol, <b>54</b> ].....	112
3.2.1.4 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol ( <b>55</b> ).....	113
3.2.1.5 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona ( <b>56</b> ) .....	114
3.2.1.6 Ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-óico, <b>22</b> ) .....	115
3.2.1.7 Ácido sumaresinólico (ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-olean-12-en-28-óico, <b>57</b> ) .....	116
3.2.1.8 Hederagenina (ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroxiolean-12-en-28-óico, <b>58</b> ).....	117
3.2.2 <i>A. vogelii</i> .....	118
3.2.2.1 (2 <i>Z</i> )-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida ( <b>70</b> ).....	118
3.2.2.2 Asteriscunolida A ( <b>32</b> ).....	119
3.2.2.3 Asteriscunolida C ( <b>34</b> ).....	120
3.2.2.4 Asteriscunolida D ( <b>35</b> ) .....	121
3.2.2.5 (2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> ,9 <i>E</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>36a</b> ) .....	122
3.2.2.6 (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>Z</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>37a</b> ) .....	123
3.2.2.7 (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>E</i> )-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo ( <b>38a</b> ) .....	124
3.2.2.8 Dados de <sup>13</sup> C-NMR dos compostos <b>70</b> , <b>36a</b> , <b>37a</b> e <b>38a</b> . .....	125
<b>4. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>129</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Compostos fenólicos de <i>Salvia</i> .....	7
Figura 2. Compostos antioxidantes com acção protectora em células hepáticas.	8
Figura 3. Fenóis com acção preventiva de doenças cardiovasculares. ....	9
Figura 4. Estrutura do ácido protocatecóico. ....	10
Figura 5. Flavonóides antioxidantes. ....	10
Figura 6. Monoterpenos com propriedades antioxidantes. ....	12
Figura 7. Compostos de origem natural com actividade antimicrobiana. ....	17
Figura 8. Estrutura do ácido ursólico ( <b>22</b> ) e do ácido oleanólico ( <b>23</b> ). ....	18
Figura 9. Estrutura do salvinemorol. ....	19
Figura 10. Estrutura da neo-tanchilactona ( <b>25</b> ) e da tanchinona IIA ( <b>26</b> ). ....	20
Figura 11 Estrutura da salvinorina A. ....	21
Figura 12. Compostos anticolinesterásicos de origem natural. ....	25
Figura 13. Estrutura das asteriscunolidas A, B, C e D e dos seus precursores. .	28
Figura 14. Lactonas sesquiterpénicas de <i>Asteriscus aquaticus</i> . ....	29
Figura 15. Derivados do nerolidol constituintes de <i>A. sericeus</i> . ....	29
Figura 16. Flavonóides comuns em plantas do género <i>Asteriscus</i> . ....	30
Figura 17. Derivados do bisabolenol isolados de <i>A. graveolens</i> . ....	31
Figura 18. Estrutura de 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol. ....	39
Figura 19. Correlações de NOESY do composto <b>52</b> . ....	41
Figura 20. Estrutura da nepetidina. ....	42
Figura 21. Fragmentos do espectro de massa da nepetidina. ....	43
Figura 22. Estrutura da nepeticina. ....	44
Figura 23. Fragmentos do espectro de massa da nepeticina. ....	45
Figura 24. Estrutura de 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol. ....	46
Figura 25. Estrutura de 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona. ....	47
Figura 26. Estrutura do ácido ursólico. ....	48
Figura 27. Estrutura do ácido sumaresinólico. ....	51
Figura 28. Estrutura da hederagenina. ....	52
Figura 29. Compostos fenólicos identificados em <i>S. sclareoides</i> . ....	56

Figura 30. Ácidos triterpénicos com acção anticolinesterásica.....	60
Figura 31. Estrutura dos compostos isolados das fracções biologicamente activas de <i>A. vogelii</i> .....	67
Figura 32. Estrutura do composto <b>70</b> . ....	68
.Figura 33. Padrão de fragmentação das asteriscunolidas. ....	70

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Salvia</i> com actividade antioxidante. ....	11
Tabela 2. Espécies de <i>Salvia</i> com actividade antibacteriana, antiviral e antifúngica.....	15
Tabela 3. Espécies de <i>Salvia</i> com actividade antitumoral.....	19
Tabela 4. Espécies de <i>Salvia</i> com actividade anticolinesterásica.....	24
Tabela 5. Dados de $^1\text{H}$ -NMR e $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$ em ppm, $J$ em Hertz) do composto <b>52</b> e correlações HMBC relevantes para a sua elucidação estrutural. ....	40
Tabela 6. Compostos fenólicos do extracto de <i>S. sclareoides</i> (% relativa de fenóis a 280 nm e conteúdo total de fenóis). ....	54
Tabela 7. Actividade anticolinesterásica dos extractos de <i>S. sclareoides</i> (expressa em % de inibição).....	58
Tabela 8. Actividade antioxidante (% de inibição e $\text{IC}_{50}$ ). ....	62
Tabela 9. Toxicidade dos extractos de <i>S. sclareoides</i> . ....	65
Tabela 10. Configurações nas ligações duplas das asteriscunolidas.....	73
Tabela 11. Configurações nas ligações duplas dos ésteres <b>36a</b> , <b>37a</b> e <b>38a</b> ...	77
Tabela 12. Actividade fitotóxica do extracto e das fracções de <i>A. vogelii</i> (% de inibição do crescimento). ....	78
Tabela 13. Actividade antifúngica (% de inibição do crescimento) do extracto e fracções de <i>A. vogelii</i> .....	80
Tabela 14. Actividade fitotóxica <sup>a</sup> (% de inibição do crescimento) e antitumoral <sup>b</sup> ( $\text{IC}_{50}$ ) dos compostos isolados das fracções bioactivas de <i>A. vogelii</i> . ....	81
Tabela 15. Dados de $^{13}\text{C}$ NMR dos compostos <b>70</b> , <b>33a</b> , <b>37a</b> e <b>38a</b> ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno, 250 MHz, $\delta$ em ppm). ....	125



## **1. INTRODUÇÃO**





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Género *Salvia* - Generalidades

A utilização de plantas com propriedades terapêuticas perdura há séculos e é comum a todas as culturas, estimando-se que cerca de 25% dos fármacos modernos provêm directa ou indirectamente de espécies vegetais (Imanshahidi e Hosseinzadeh, 2006).

A promoção e o uso de plantas medicinais e a sua integração nos sistemas de saúde foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde e em diversos países, como por exemplo a França, são já prescritas preparações de origem vegetal, em paralelo aos medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica (Lamendin *et al.*, 2004). Na Europa sempre foram muito populares a alfazema (*Lavandula officinalis* Chaix), o hipericão (*Hypericum perforatum*), a camomila (*Matricaria recutita* L.) ou a salva (*Salvia officinalis* L.).

O género *Salvia* pertence à família Lamiaceae e é o que apresenta maior número de espécies, mais de 900, distribuídas por todo o mundo, embora com maior incidência na América Central e América do Sul, onde se encontram aproximadamente 50% das espécies conhecidas. Na Península Ibérica encontram-se, por exemplo, as espécies *S. officinalis* e *Salvia sclareoides* Brot.

Conhecida desde a Antiguidade, a salva era considerada pelos nossos antepassados como uma planta quase milagrosa, capaz de curar todas as doenças. A designação "*Salvia*", aliás, tem origem no termo latino "*salvare*" que significa "curar" (Topçu, 2006). Os antigos gregos cultivavam a salva como planta medicinal e os Druidas usavam-na para curar febres, tosse, bronquite e reumatismo. O cultivo da salva na Europa teve início na Idade Média quando os monges beneditinos introduziram esta espécie nos jardins dos seus mosteiros. A crença nos seus poderes curativos era tão grande que deu origem a um ditado provençal segundo o qual " *Qu' à de sauvín din soun jardin, a pas*

*besoun de medicin'* e até o rei Luís XIV bebia todas as manhãs duas taças de infusão de salva (Lamendin *et al.*, 200). Ao longo dos anos têm sido atribuídas a esta planta propriedades espasmolíticas e anti-sépticas (Newall *et al.*, 1996), adstringentes e cicatrizantes (Lamendin *et al.*, 2004). O chá de folhas de salva é recomendado para tratar problemas de estômago e de coração, dores de cabeça, ansiedade e hipertensão e a inalação dos vapores do cozimento das folhas permite aliviar os sintomas de bronquite (Rodrigues, 2006). As folhas de salva têm uma vasta aplicação culinária graças às suas qualidades aromáticas, sendo também empregue como estimulante do apetite (Proença da Cunha *et al.*, 2009).

Outras espécies de *Salvia* têm sido referidas pela sua aplicação medicinal como, por exemplo, a sálvia-dos-prados (*Salvia pratensis* L.) e a salva-esclarea ou sálvia-dos-jardins (*Salvia sclarea* L.), conhecidas pelos seus efeitos adstringentes e cicatrizantes (Lamendin *et al.*, 2004). Esta última produz óleos essenciais com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Moretti *et al.*, 1997). As espécies do género *Salvia* têm reputação de exercer efeitos benéficos na memória e de serem eficazes no tratamento da depressão e da isquemia cerebral (Howes *et al.*, 2003; Orhan *et al.*, 2007). Ulubelen e Topçu referiram a actividade antidiabética e antitumoral de espécies de *Salvia* endémicas da Turquia (Ulubelen e Topçu, 1992; Ulubelen, 2003) e Kivrak (2009) salientou a aplicação das plantas deste género no tratamento de dores de estômago, dores de cabeça, constipações, feridas e infecções da pele.

Também a medicina tradicional chinesa recorre há séculos a espécies de *Salvia*, como por exemplo a *Salvia miltiorrhiza* Bunge, usada há mais de mil anos para tratar doenças de natureza cerebrovascular (Ren *et al.*, 2004) e cardiovascular, em particular a angina de peito e o enfarte do miocárdio (Wang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Na região sul do rio Yangtze encontra-se uma espécie endémica, *Salvia chinensis* Benth., utilizada no tratamento da hepatite, da nefrite e da dismenorreia, sendo também conhecida pelas suas propriedades antitumorais (Wang *et al.*, 2009).

As plantas medicinais possuem actividades biológicas muito diversas de tal forma que poderão ser usadas para fins terapêuticos diferentes dos tradicionais. Um estudo realizado com ratinhos criou novas perspectivas para o tratamento de uma grave doença social como o alcoolismo. Após ter sido induzida a habituação dos animais a uma solução alcoólica, procedeu-se ao seu tratamento administrando oralmente um extracto de *S. miltiorrhiza*. Os animais reduziram significativamente o consumo da solução alcoólica tendo passado a evidenciar uma clara preferência pelo consumo de água (Carai *et al.*, 2000).

A acção farmacológica dos extractos vegetais resulta das propriedades dos seus constituintes químicos que lhes conferem actividades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral, entre outras. Os mesmos compostos podem condicionar, ainda que parcialmente, o tipo de interacções ecológicas das plantas no seu habitat; por exemplo, existem metabolitos que repelem insectos evitando que estes se alimentem das plantas, pelo que podem ser investigados como potenciais agroquímicos protectores de culturas de interesse comercial. O papel dos extractos vegetais neste tipo de interacções foi comprovado por Pavela (2004) que registou uma elevada toxicidade do extracto metanólico de *S. officinalis* em larvas da borboleta do algodão *Spodoptera littoralis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Cetin e colaboradores (2006) quando testaram o extracto etanólico da parte aérea de *S. sclarea* em larvas do mosquito *Culex pipiens* L.

## **1.2 Actividades biológicas de *Salvia***

Os tipos de actividade biológica mais comuns de espécies de *Salvia* vão ser abordados nesta secção, destacando-se pela sua importância a nível farmacológico e/ou agroquímico as actividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. O efeito de extractos de *Salvia* no sistema nervoso é particularmente relevante, devido à necessidade crescente de produzir novos fármacos para o combate de patologias neurodegenerativas,

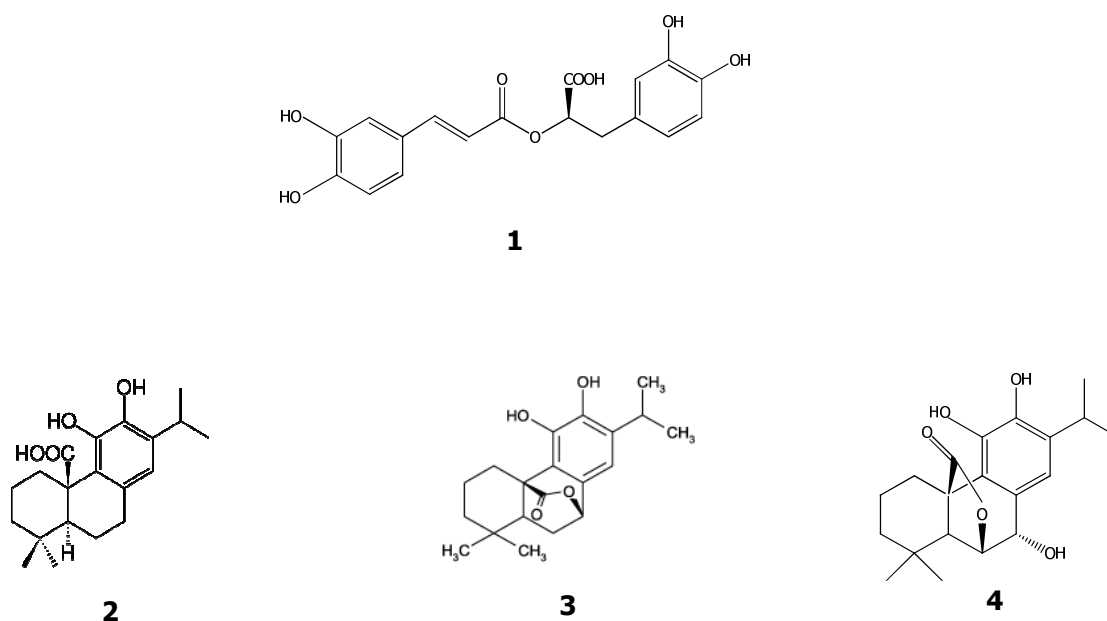
cuja incidência irá aumentar significativamente nos próximos anos. No que respeita à doença de Alzheimer, as estimativas da Organização Mundial da Saúde em 2007 apontavam para 18 milhões de doentes em todo o mundo, prevendo-se actualmente uma duplicação desse número até 2025.

### **1.2.1 Acção antioxidante**

Os compostos antioxidantes desempenham um papel importante na indústria alimentar pois evitam a deterioração de alimentos embalados, a qual se deve, muitas vezes, à peroxidação dos lípidos (Suhaj, 2006). Plantas aromáticas usadas na culinária como a salva e o alecrim são fontes de antioxidantes naturais, quimicamente estáveis, sem quaisquer inconvenientes para a saúde humana, pelo que os seus extractos podem ser usados como conservantes alimentares, substituindo assim os antioxidantes sintéticos (Lugasi *et al.*, 2006; Oberdieck, 2004). Também a indústria farmacêutica tem manifestado um interesse crescente neste tipo de antioxidantes naturais dado que poderão constituir ou ser precursores de novos medicamentos capazes de prevenir e tratar doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Zhu *et al.*, 2004), frequentemente associadas a processos oxidativos que ocorrem nas células.

Considerando as vantagens indicadas, tem-se procedido à investigação das propriedades antioxidantes de numerosos extractos vegetais, bem como ao isolamento e identificação dos respectivos constituintes maioritários. Estes estudos demonstraram que os extractos polares mais ricos em compostos fenólicos são geralmente mais activos (Lugasi *et al.*, 2006; Ozgen *et al.*, 2006; Unal *et al.*, 2008). Tosun e colaboradores (2009) estabeleceram uma correlação linear positiva entre a actividade antioxidante e o conteúdo total de compostos fenólicos de alguns extractos. Posteriormente, Kamatou investigou as propriedades antioxidantes de espécies de *Salvia* sul-africanas pelo método de DPPH e concluiu que os extractos com maior conteúdo fenólico eram muito mais activos (Kamatou *et al.*, 2010). O ácido rosmarínico (**1**), um dos ácidos fenólicos mais abundantes em espécies de *Salvia*, é referido como um dos

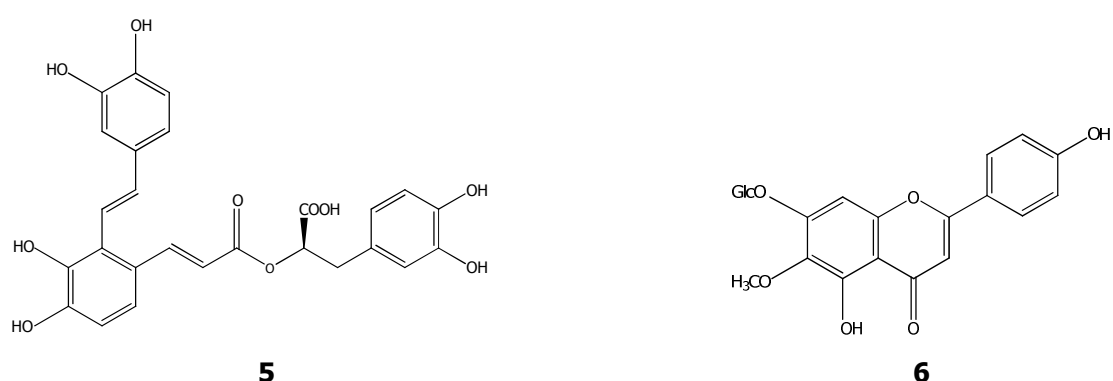
antioxidantes naturais mais activos em testes realizados pelos métodos de DPPH e ABTS (Exarchou *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998). Fenóis diterpénicos como o ácido carnósico (**2**), o carnosol (**3**) e o rosmanol (**4**), isolados da óleo-resina de *S. officinalis* (Cuvelier *et al.*, 1994) e da infusão aquosa de *Salvia fruticosa* Mill. (Matsingou *et al.*, 2003), possuem igualmente um elevado potencial antioxidante. A figura 1 esquematiza a estrutura destes compostos.



**Figura 1.** Compostos fenólicos de *Salvia*.

As espécies com propriedades antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção de doenças resultantes de processos oxidativos, tal como evidenciado por Oboh (2009) que testou extractos aquosos das folhas de *S. officinalis* e obteve uma inibição significativa da peroxidação de lípidos em homogenatos de cérebro e de fígado de rato. Resultados semelhantes tinham sido anteriormente divulgados por Lima e colaboradores (2007) quando investigaram o efeito protector de extractos de salva em células hepáticas HepG2 e concluíram que o extracto metanólico, mais rico em ácido rosmarínico (**1**) do que o extracto aquoso, era mais eficiente, protegendo as células da peroxidação de lípidos induzida pelo hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BHP).

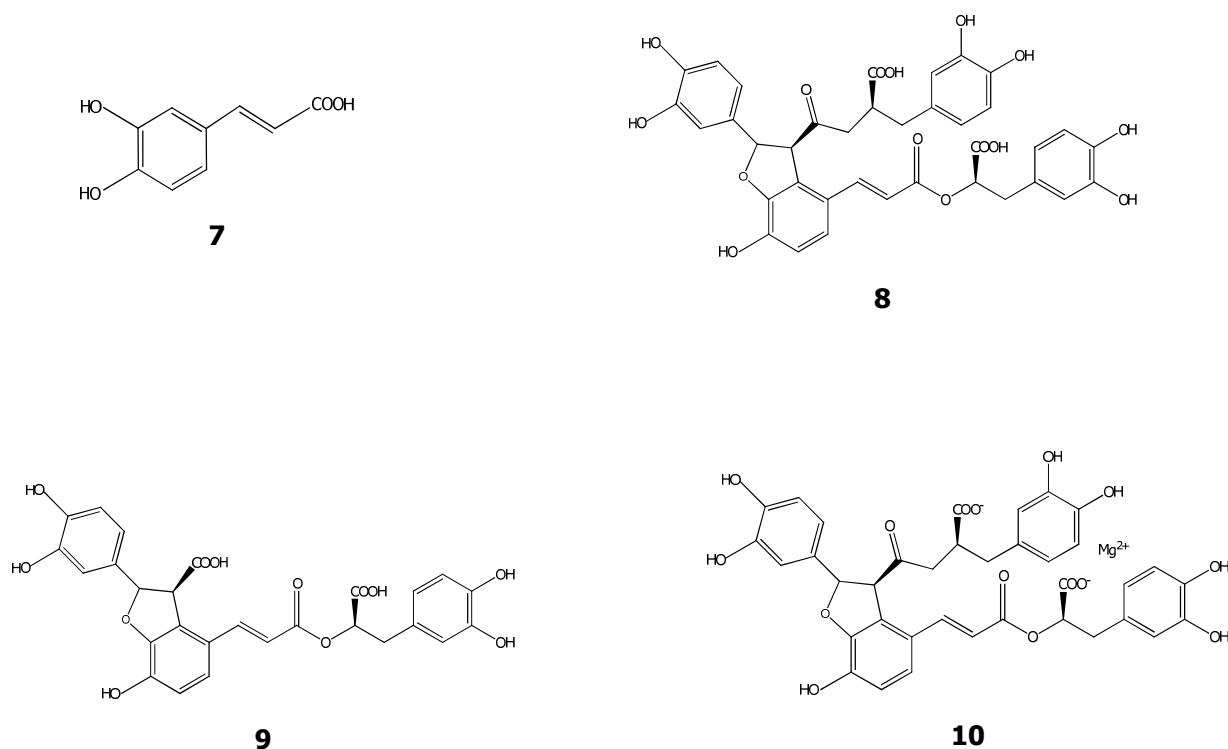
Outras espécies do género *Salvia* têm sido referidas como fonte de compostos protectores do fígado entre os quais se podem destacar o ácido salvianólico A (**5**) e a homoplantaginina (**6**), cuja estrutura está representada na figura 2. O ácido salvianólico A, isolado do extracto de *S. miltiorrhiza*, evita lesões das membranas celulares causadas pela peroxidação de lípidos (Liu *et al.*, 1992). Recentemente, foi demonstrado que a homoplantaginina, constituinte do extracto de *Salvia plebeia*, tem uma acção antioxidante que reduz eficazmente a necrose de células do fígado de ratinhos (Qu *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Compostos antioxidantes com acção protectora em células hepáticas.

De acordo com um estudo conduzido por Xia, a aplicação intravenosa de um extracto *S. miltiorrhiza* reduz a peroxidação de lípidos plasmáticos em pacientes submetidos a *bypass* cardiopulmonar (Xia *et al.*, 2003). O papel desta planta na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares poderá estar relacionado com o seu elevado conteúdo de compostos fenólicos derivados do ácido cafeico (**7**). Segundo um estudo realizado por Lam (2006), o ácido salvianólico B (**8**) actua como relaxante dos vasos sanguíneos, inibindo os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e impedindo a contracção do músculo liso das artérias coronárias (Lam *et al.*, 2006). Zhao (2008) demonstrou que este composto é capaz de proteger o endotélio venoso de lesões induzidas pelo peróxido de hidrogénio.

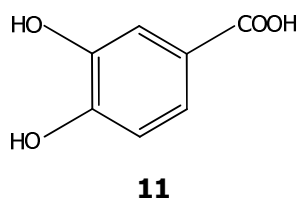
Mais recentemente, Gao e colaboradores (2009) registaram uma considerável redução da viscosidade do sangue em cães *beagle* após a aplicação intravenosa de ácido salvianólico B (**8**) numa dose de 9 mg/kg. Outros derivados do ácido cafeico (**7**) que contribuem para a acção medicinal de *S. miltiorrhiza* são o ácido litospérmico (**9**) e o litospermato B de magnésio (**10**). Este último referido por Liu (2009) como captador de radicais superóxido e inibidor da actividade de xantina oxidase, diminui a pressão sistólica e a pressão diastólica em ratinhos com hipertensão causada por insuficiência renal induzida. A estrutura destes compostos está representada na figura 3.



**Figura 3.** Fenóis com acção preventiva de doenças cardiovasculares.

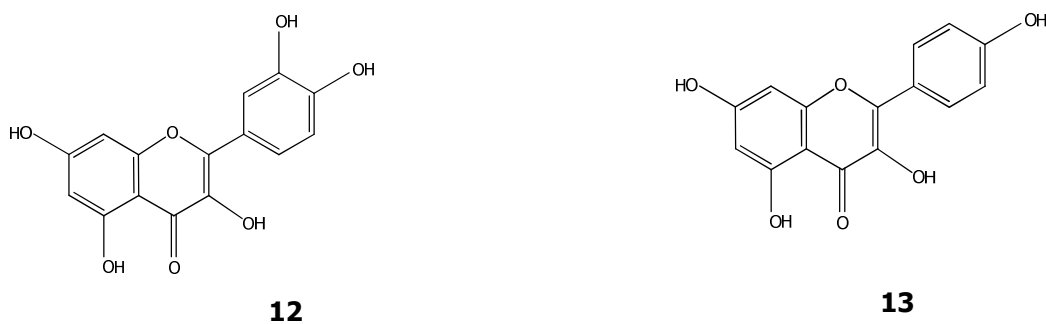
A importância destes fenóis na regulação da pressão sanguínea e da função renal tinha sido já reconhecida por Yokozawa num estudo realizado em 1995, que permitiu verificar que o ácido litospérmico (**9**) e o litospermato B de magnésio (**10**) aumentam a excreção de Na<sup>+</sup>, melhorando assim a função renal (Yokozawa et al., 1995). Cao e colaboradores (2009) demonstraram que o

ácido protocatecico (**11**, figura 4), ao ser metabolizado pelas células cardíacas, reduz a taxa de oxidação dos ácidos gordos, protegendo assim o miocárdio da isquemia.



**Figura 4.** Estrutura do ácido protocatecico.

Diversos estudos têm demonstrado que, além dos ácidos fenólicos, existem outros compostos fenólicos responsáveis pela actividade antioxidante. Weng isolou flavonóides activos do extracto de *Salvia plebeia* (Weng *et al.*, 2000) e a quercitina (**12**) e o canferol (**13**) (figura 5) são conhecidos como antioxidantes muito eficazes.



**Figura 5.** Flavonóides antioxidantes.

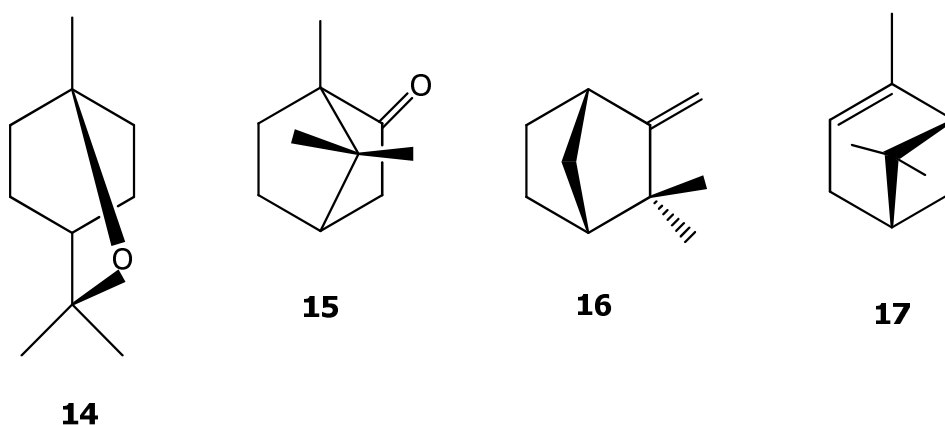
Na tabela 1 são referidas, a título de exemplo, outras espécies de *Salvia* com propriedades antioxidantes.



**Tabela 1.** Espécies de *Salvia* com actividade antioxidante.

<b>Espécie</b>	<b>Extracto/ compostos</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<i>S. officinalis</i> <i>S. sclarea</i> <i>S. glutinosa</i> <i>S. pratensis</i>	Extracto em metanol	DPPH	Miliauskas <i>et al.</i> , 2004
<i>S. viridis</i>	Extracto aquoso	DPPH	Erdemoglu <i>et al.</i> , 2006
<i>S. multicaulis</i>			
<i>S. hispanica</i>	Quercitina ( <b>12</b> ) Canferol ( <b>13</b> )	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico e ABTS	Reys-Caudillo <i>et al.</i> , 2008
<i>S. barrelieri</i>	Extracto em acetona Diterpenos	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico, DPPH, ABTS e CUPRAC	Kolak <i>et al.</i> , 2009
	Extracto em acetona Diterpenos	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico e DPPH	Kabouche <i>et al.</i> , 2007
<i>S. potetillifolia</i>	Extracto em etanol	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico e DPPH	Kivrak <i>et al.</i> , 2009
<i>S. microstegia</i>	Extracto em metanol	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico e DPPH	Ozcan <i>et al.</i> , 2009
<i>S. leriifolia</i>	1,8-cineol ( <b>14</b> ), cânfora ( <b>15</b> ) Canfeno ( <b>16</b> ), $\alpha$ -pineno ( <b>17</b> )	DPPH	Loizo <i>et al.</i> , 2009
<i>S. verticillata</i>	Extracto em metanol	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico e DPPH	Tosun <i>et al.</i> , 2009
<i>S. schlechteri</i>	Extracto em metanol e clorofórmio (1:1)	DPPH	Kamatou <i>et al.</i> , 2010
<i>S. fruticosa</i> <i>S. kronenburgii</i> <i>S. potentillifolia</i>	Extracto em metanol	DPPH	Senol <i>et al.</i> , 2010

A análise da tabela 1 permite verificar que os monoterpenos vulgarmente encontrados nos óleos essenciais também são agentes antioxidantes como o 1,8-cineol (**14**), a cânfora (**15**), o canfeno (**16**) e  $\alpha$ -pineno (**17**). A estrutura destes compostos está representada na figura 6.



**Figura 6.** Monoterpenos com propriedades antioxidantes.

### 1.2.2. Acção anti-inflamatória

É frequente que plantas com propriedades antioxidantes exibam também uma actividade anti-inflamatória. Num estudo realizado com 40 voluntários, procedeu-se ao tratamento de um eritema, induzido por radiação UV, com um unguento hidrofílico contendo 2% do extracto das folhas de *S. officinalis*. Verificou-se que a acção anti-inflamatória do extracto era idêntica à da hidrocortisona (1%), usada como controlo positivo, o que sugere que estes extractos poderão ser explorados como forma de tratamento de doenças inflamatórias da pele (Reuter *et al.*, 2007). O extracto em clorofórmio de *Salvia triloba* (sin. *Salvia fruticosa* Mill.) evidenciou elevada actividade anti-inflamatória em ensaios realizados por El-Sayed (2006) tendo sido também demonstrado que o seu efeito ulcerogénico é inferior ao do ácido acetilsalicílico. Os extractos em acetona e em metanol de *Salvia mexicana* (Delira *et al.*, 2003) revelaram elevada actividade antioxidante e anti-inflamatória. De acordo com Kuhlmann

(2006), a presença de diterpenos fenólicos antioxidantes como o ácido carnósico (**2**) também confere propriedades anti-inflamatórias aos extractos vegetais. Esta conclusão foi confirmada pelo grupo de Reuter que registou uma actividade anti-inflamatória *in vitro* dos compostos **2** e **3** (Reuter *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Acção antimicrobiana

O desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos tem vindo a aumentar, preocupando os responsáveis pelos serviços de saúde pública em todo o mundo. Afecções cutâneas como o acne e o eczema seborreico, associadas à bactéria *Propionibacterium acnes* e erupções cutâneas devidas ao vírus *Herpes simplex* também têm evidenciado um carácter persistente de difícil tratamento. O fungo *Candida albicans* ocorre frequentemente na pele e nas mucosas de forma assintomática mas, quando se desenvolve excessivamente, origina afecções como intertrigo e candidíase (Weckesser *et al.*, 2007).

As infecções diagnosticadas em doentes hospitalizados têm vindo a aumentar e devem-se muitas vezes a agentes oportunistas como a bactéria *Morganella morganii*, que se encontra no intestino dos mamíferos, onde é inofensiva, mas que pode causar infecções pós-operatórias. Verifica-se uma situação idêntica com espécies dos géneros *Klebsiella* e *Enterobacter* que, sendo elementos da flora intestinal, têm sido identificadas como agentes infecciosos das vias urinárias e das vias respiratórias. No género *Staphylococcus* salientam-se as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, responsável por infecções de feridas e por certas formas de pneumonia, e *Staphylococcus epidermis*, um microrganismo comensal da pele que está na origem de endocardites e infecções pós-operatórias. Estas espécies e a bactéria *Escherichia coli*, comensal do cólon humano, são ainda responsáveis por infecções do tracto urinário. Muitos dos pacientes submetidos a cirurgia apresentam dificuldades de cicatrização que se devem a infecções causadas por bactérias do género *Streptococcus* (Prescott *et al.*, 1996).

Impulsionado pela necessidade de encontrar novos fármacos, o estudo de produtos naturais tem-se focado nos constituintes dos óleos essenciais, conhecidos há séculos pelas suas propriedades anti-sépticas e antimicrobianas (Halcon *et al.*, 2004; Kalembe *et al.*, 2003). Este estudo foi entretanto alargado, quer a fracções não voláteis dos extractos vegetais medicinais, tradicionalmente usados para tratar infecções e inflamações cutâneas, quer a outras espécies do mesmo género, com vista ao isolamento e identificação de compostos que possam ser explorados como agentes antimicrobianos ou antivirais.

Muitas plantas produzem compostos que desempenham um papel protector relativamente a pragas de fungos. O conhecimento deste tipo de interacções, aliado ao aparecimento de populações resistentes aos pesticidas e ao impacto negativo que estes têm no meio ambiente, tem motivado um interesse crescente da indústria agroquímica nas espécies vegetais com reconhecida actividade biológica. As plantas aromáticas utilizadas há séculos para conservar alimentos são vistas como uma possível fonte de novos antifúngicos, bastante vantajosos relativamente aos pesticidas sintéticos pois, além de poderem combater as estirpes resistentes, não apresentam toxicidade e, sendo biodegradáveis, reduzem a contaminação química do meio ambiente (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

Na tabela 2 são referidos alguns dos extractos de *Salvia* ou dos seus constituintes que foram testados quanto à sua actividade antibacteriana, antifúngica e antiviral.

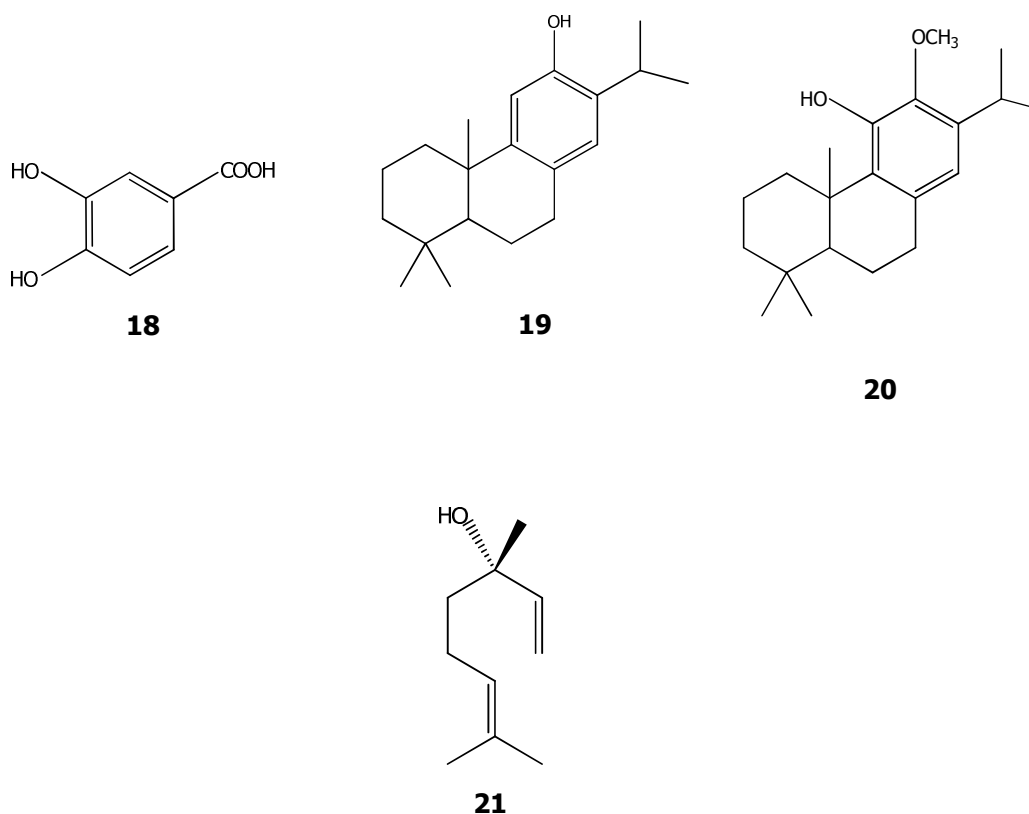
**Tabela 2.** Espécies de *Salvia* com actividade antibacteriana, antiviral e antifúngica.

<b>Espécie</b>	<b>Extracto/Compostos</b>	<b>Tipo de Actividade</b>	<b>Referência</b>
<i>S. officinalis</i>	Extracto em metanol Compostos fenólicos	Antibacteriana - <i>E.coli</i> <i>M. morganii</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. Antifúngica - <i>C. albicans</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2004
	Extracto em etanol Extracto aquoso	Antibacteriana – <i>P. acne</i> <i>S. aureus</i>	Leelapornpisid <i>et al.</i> , 2005
	Extracto aquoso	Antiviral - <i>H. simplex</i>	Nolkemper <i>et al.</i> , 2006
	Extracto supercrítico com CO <sub>2</sub> Ácido carnósico (2)	Antibacteriana - <i>P. acnes</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Bacillus subtilis</i>	Weckesser <i>et al.</i> , 2007
<i>S. miltiorrhiza</i>	Ácido litospérmico (9) Ácido litospérmico B (11)	Antiviral - HIV-1.	Abd-Elazem <i>et al.</i> , 2002
	Extracto aquoso Extracto em acetato de etilo	Antiviral - Enterovírus 71.	Wu <i>et al.</i> , 2003
	Aldeído protocatecóico (18)	Antiviral - HBV (vírus da hepatite B dos patos)	Zhou <i>et al.</i> , 2007
<i>S. cedronella</i>	Extracto em metanol (extracto rico em fenóis)	Antiviral - <i>H. simplex</i> vírus da gripe A/Aichi e A/Weybridg	Alim <i>et al.</i> , 2009
<i>S. ceratophylla</i>	1-Oxoferruginol (19)	Antibacteriana - <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermis</i>	Ulubelen, 2003
<i>S. jaminiana</i>	Extracto em acetona	Antibacteriana – <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Streptococcus a-hemolitic</i>	Kabouche <i>et al.</i> , 2005
<i>S. mycrophyla</i>	Acido 12-metoxicarnósico (20)	Antibacteriana - <i>S. aureus</i>	Aydogmus <i>et al.</i> , 2006

<i>S. microstegia</i>	Extracto em metanol Compostos fenólicos	Antibacteriana	Ozcan <i>et al.</i> , 2009
<i>S. sclarea</i>	Óleo essencial	Antifúngica* - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Sclerotium cepivorum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Pitarokili <i>et al.</i> , 2002
<i>S. fruticosa</i>	Extracto em éter de petróleo	Antifúngica* - <i>Alternaria solani</i> <i>Rhizoctonia solani</i>  Inibição da germinação dos esporos* – <i>Alternaria Solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Verticillium dahlia</i> <i>F. oxysporum</i> f. subsp. <i>melonis</i>	Abou-Jawdah <i>et al.</i> , 2002
	Óleo essencial	Antifúngica* - <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium solani</i>	Pitarokili <i>et al.</i> , 2003
<i>S. desoleana</i>	Óleo essencial Linalol ( <b>21</b> )	Antifúngica* - <i>Micromicetes</i> sps	Sokovic <i>et al.</i> , 2009
<i>S. tomentosa</i> <i>S. aucheri</i> <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i>	Óleo essencial	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra (ATCC 25177)	Askun <i>et al.</i> , 2010

\* Pragas fitopatogénicas

Alguns dos extractos indicados na tabela 2 contêm compostos fenólicos como princípios activos (compostos **18**, **19** e **20**, figura 7). No entanto, os componentes dos óleos essenciais como o linalol (**21**) também podem desempenhar um papel importante como agentes antifúngicos.

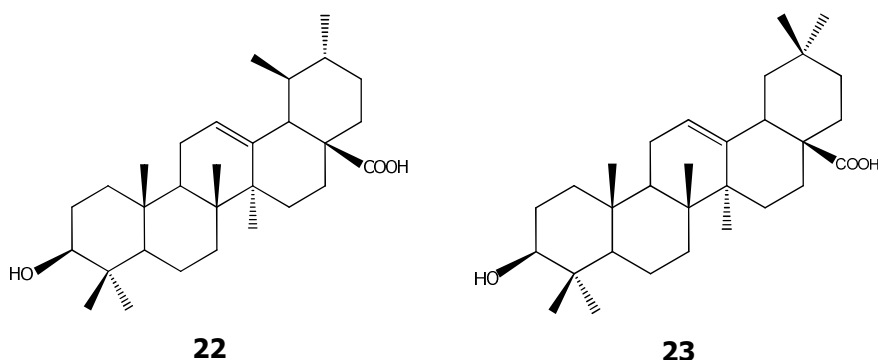


**Figura 7.** Compostos de origem natural com actividade antimicrobiana.

#### 1.2.4 Acção antitumoral

Apesar da investigação intensiva nesta área, ainda não foi possível encontrar tratamentos verdadeiramente eficazes do ponto de vista curativo pelo que se tem prosseguido o estudo de extractos vegetais na busca de novos compostos com acção antitumoral.

Os estudos realizados com extractos de diversas espécies de *Salvia* têm permitido isolar e identificar compostos com actividade antitumoral, designadamente, diterpenos de *S. miltiorrhiza* e triterpenos derivados do ácido ursólico (**22**) e do ácido oleanólico (**23**) (figura 8) isolados dos extractos polares de *S. officinalis* e de *S. chinensis* (tabela 3). O ácido oleanólico, um dos triterpenos mais abundantes no género *Salvia*, é um potente inibidor do crescimento das células da leucemia humana HL-60 (Wang *et al.* 2006).



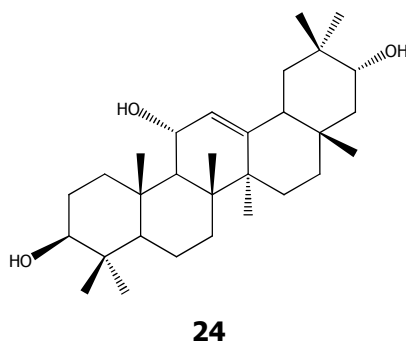
**Figura 8.** Estrutura do ácido ursólico (**22**) e do ácido oleanólico (**23**).

Os ácidos fenólicos, nomeadamente os ácidos rosmarínico (**1**) e salvianólico B (**8**) reduzem a proliferação de diversos carcinomas (Xavier *et al.*, 2009; Hao *et al.*, 2009).

As topoisomerasas são enzimas nucleares que desempenham um papel essencial nos processos de replicação, de transcrição e de segregação dos cromossomas durante a mitose pelo que os inibidores destes enzimas são considerados um alvo preferencial nas estratégias de combate ao cancro. Segundo um estudo realizado por Wada (2001), compostos triterpénicos derivados do lupano e do oleaneno inibem eficazmente a topoisomerase II humana. O mesmo autor refere igualmente a acção inibidora do ácido ursólico (**22**).



O salvinemorol (**24**), representado na figura 9, é um triterpeno pentacíclico com a estrutura básica de um oleneno com uma ligação dupla em C-12 referido por Topçu como um agente antitumoral (Topçu *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Estrutura do salvinemorol.

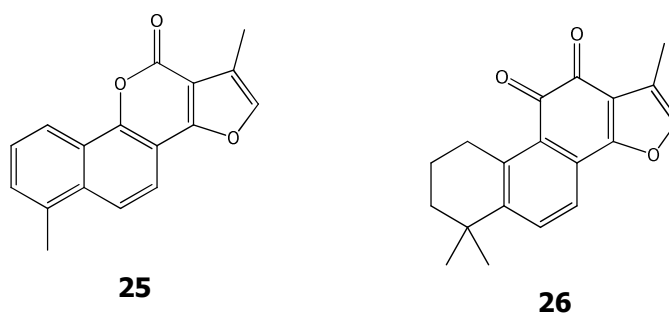
Na tabela 3 são referenciados alguns exemplos de extractos de *Salvia* ou dos seus constituintes maioritários com actividade antitumoral.

**Tabela 3.** Espécies de *Salvia* com actividade antitumoral.

Espécie	Extracto/ compostos	Linhas celulares	Referência
<i>S. miltiorrhiza</i>	Neo-tanchilactona ( <b>25</b> )	Adenocarcinoma da mama MDA-MB231 e MCF-7	Wang <i>et al.</i> , 2004
	Tanchinona IIA ( <b>26</b> )	Carcinoma do fígado HepG2	Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>S. kronenburgii</i>	Salvinemorol ( <b>24</b> )	Cancro do ovário A2780	Topçu <i>et al.</i> , 2004
<i>S. menthaefolia</i> <i>S. lanigera</i>	Extracto em metanol	Glioblastoma DBTRG-05MG, T98G e U-87MG Adenocarcinoma do cólon WiDr e HT-29 Adenocarcinoma da próstata MDA Pca2b Carcinoma do ovário JEG-3 Adenocarcinoma do endométrio HEC-1A e Linfoblasto B (CIR)	Fiore <i>et al.</i> , 2006

<i>S. officinalis</i>	Ácido ursólico ( <b>22</b> )	Redução da proliferação de metástases do melanoma B16 nos pulmões de ratinhos	Jedinak <i>et al.</i> , 2006
<i>S. fruticosa</i>	Extracto em metanol	Fibrosarcoma L929sA Adenocarcinoma da mama MDA-MB231 e MCF-7	Kaileh <i>et al.</i> , 2007
<i>S. lanceolata</i>	Extractos	Adenocarcinoma do cólon HT-29 Adenocarcinoma da mama MCF-7	Kamatou <i>et al.</i> , 2008
<i>S. hypargeia</i>	Extracto em acetona	Cancro do ovário A2780	Topçu <i>et al.</i> , 2008
<i>S. fruticosa</i> e <i>S. officinalis</i>	Extracto aquoso Ácido rosmarínico	Carcinoma do cólon HCT-15 e CO115	Xavier <i>et al.</i> , 2009
<i>S. chinensis</i>	Extracto em etanol Triterpenos	Leucemia humana HL-60	Wang <i>et al.</i> , 2009

Os compostos **25** e **26** (figura 10) são diterpenos característicos dos extractos de *S. miltiorrhiza* com uma notável actividade antitumoral.

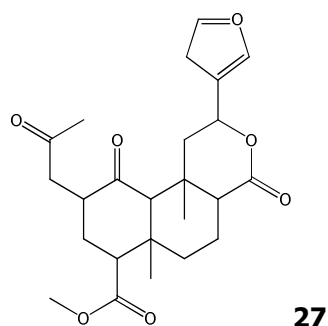


**Figura 10.** Estrutura da neo-tanchilactona (**25**) e da tanchinona IIA (**26**).

### 1.2.5 Acção no sistema nervoso

Na farmacopeia europeia as espécies *S. officinalis* e *Salvia lavandulaefolia* têm reputação de melhorar a memória, qualidade que compartilham com a espécie

chinesa *S. miltiorrhiza*. Encontra-se igualmente documentado o efeito analgésico dos extractos de *Salvia aegyptiaca*, *Salvia aethiopis*, *Salvia leriifolia* e *Salvia africana-lutea*. As espécies *S. sclarea*, *S. leriifolia*, *S. triloba*, *S. miltiorrhiza* e *S. officinalis* têm sido investigadas pela sua acção sedativa e hipnótica e a *Salvia divinorum* é famosa pelo seu efeito alucinogénico (Imanshahidi e Hosseinzadeh, 2006). Esta planta, usada tradicionalmente pelos curandeiros da comunidade mexicana Mazatec, em cerimónias espirituais, contém um diterpeno psicotrópico, a salvinorina-A (**27**) que induz alucinações profundas (John *et al.*, 2006). Conquanto não se conheça completamente o mecanismo de acção da salvinorina-A, pensa-se que actua como agonista dos receptores K-opiídeos (McClatchey *et al.*, 2009).



**Figura 11.** Estrutura da salvinorina A.

A melhoria das capacidades cognitivas é uma das propriedades terapêuticas dos extractos vegetais que mais interesse suscita, uma vez que as plantas medicinais utilizadas para tratar a perda de memória em idades avançadas poderão fornecer compostos capazes de retardar a progressão da doença de Alzheimer. Esta afecção degenerativa do sistema nervoso, descrita em 1906 pelo neurologista Alois Alzheimer, provoca alterações do desempenho cognitivo com graves repercussões nas actividades sociais e profissionais e afecta sobretudo a população mais idosa. O aumento da esperança média de vida no Ocidente tende a agravar esta situação o que gerou a necessidade de desenvolver novos meios de tratamento. Grande parte da investigação realizada neste domínio tem sido direccionada para o estudo de plantas como

*Ginkgo biloba*, *Panax ginseng* (Mantle *et al.*, 2000) e *S. miltiorrhiza* (Ren *et al.*, 2004) utilizadas há séculos na medicina oriental para atenuar o declínio das funções cognitivas e minorar as consequências das doenças cerebrovasculares. Entre as espécies europeias usadas para tratar a perda de memória, têm merecido particular atenção as espécies do género *Salvia*, nomeadamente, a *S. officinalis*, a *S. lavadulaefolia* e a *S. fruticosa*.

A doença de Alzheimer caracteriza-se pelo aparecimento de duas lesões principais: a placa senil e a degenerescência neurofibrilar (Areias Grilo, 2009). A placa senil é uma lesão extracelular, localizada essencialmente no córtex cerebral, resultante da deposição da proteína beta-amilóide. A degenerescência neurofibrilar é uma lesão intracelular constituída por filamentos helicoidais de uma proteína, a proteína tau, que nos doentes de Alzheimer se apresenta hiperfosforilada. Verifica-se ainda uma redução do número de neurónios, de ramificações dendríticas e de sinapses (Areias Grilo, 2009).

A perda neuronal afecta os sistemas de neurotransmissores que lhes estão associados (McClatchey *et al.*, 2009). Quando ocorre a degeneração dos neurónios que asseguram o funcionamento dos sistemas colinérgicos verifica-se uma consequente diminuição da concentração de acetilcolina, neurotransmissor deste sistema (Areias Grilo, 2009). A acetilcolina é libertada pelo neurónio pré-sináptico na fenda inter-sináptica quando ocorre um estímulo. Depois de percorrer o espaço inter-sináptico, a acetilcolina liga-se aos receptores de membrana do neurónio pós-sináptico. Estes receptores, designados por receptores colinérgicos, podem ser de dois tipos, muscarínicos ou nicotínicos. Quando a acetilcolina se liga a estes receptores desencadeia-se novo impulso nervoso no neurónio pós-sináptico, fazendo assim com que o estímulo seja transmitido. A diminuição da concentração de acetilcolina traduz-se por dificuldades no processo de memorização.

O mecanismo de acção dos extractos vegetais no que respeita à doença de Alzheimer ainda não está completamente esclarecido mas existem evidências

de que implica actividades anticolinesterásicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, estrogénicas (Mantle *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 2001) e interacções com os receptores colinérgicos. Esta última foi investigada por Eidi (2006) que, por meio de ensaios realizados com ratinhos, concluiu que o extracto etanólico das folhas de *S. officinalis* potencia o processo de retenção de memória quando os receptores muscarínicos e nicotínicos são activados. No entanto, a maioria dos testes realizados com extractos vegetais consiste na determinação da sua actividade anticolinesterásica, uma vez que os medicamentos prescritos actualmente para o tratamento da doença de Alzheimer, rivastigmina, tacrina, donezepil e galantamina, têm um mecanismo de acção baseado na inibição da acetilcolinesterase. A inibição da acetilcolinesterase conduz a um aumento da concentração de acetilcolina na fenda sináptica, bem assim como do seu período de acção, melhorando significativamente as funções cognitivas. Outro enzima pertencente ao grupo das colinesterases, com papel importante na doença de Alzheimer, é a butirilcolinesterase que se encontra no plasma sanguíneo, em diversos órgãos como o fígado ou o pâncreas e na matéria branca do cérebro (Savelev *et al.*, 2004). Este enzima também hidrolisa a acetilcolina libertada no espaço inter-sináptico.

Os extractos vegetais com acção anticolinesterásica têm sido estudados como uma alternativa aos fármacos actuais que apenas retardam a progressão da doença sem exercerem uma acção verdadeiramente curativa e têm efeitos secundários adversos. Neste aspecto, as plantas do género *Salvia* têm a vantagem de não apresentarem toxicidade, contrariamente aos inibidores da acetilcolinesterase de tipo alcalóide como a galantamina, isolada do extracto da campainha branca (*Galanthus nivalis*) (Mantle *et al.*, 2000; Loizzo *et al.*, 2009). A tabela seguinte resume alguns dos numerosos estudos que atestam a actividade anticolinesterásica das espécies de *Salvia*. Sempre que possível relaciona-se a acção anticolinesterásica com a actividade antioxidante, considerada relevante no tratamento da doença de Alzheimer.

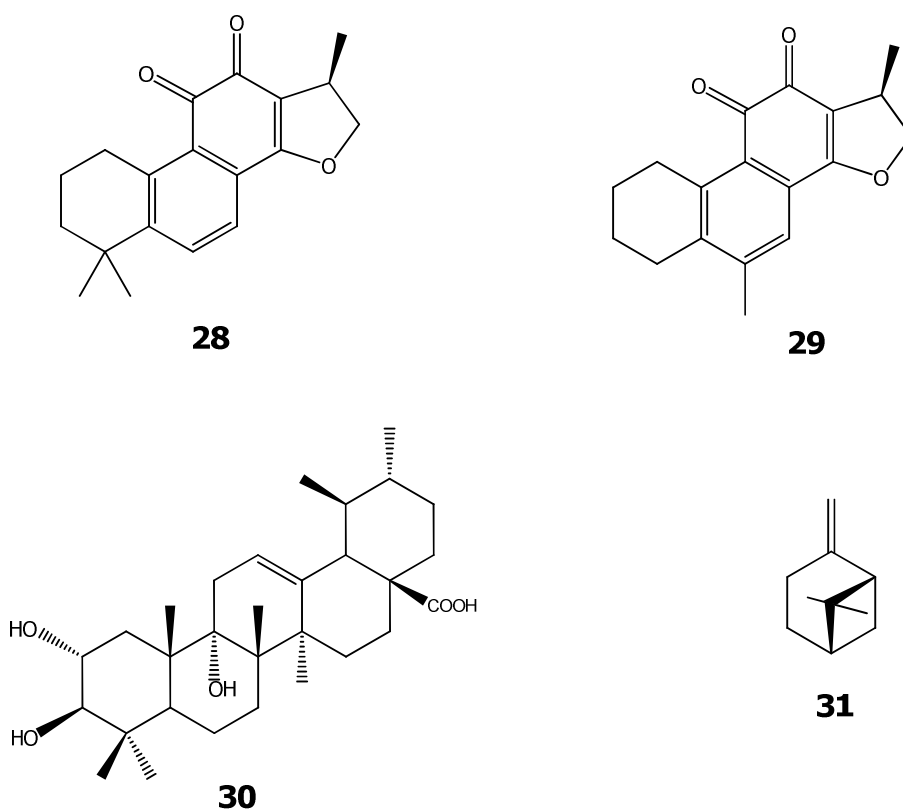
**Tabela 4.** Espécies de *Salvia* com actividade anticolinesterásica.

<b>Espécie</b>	<b>Extracto / compostos</b>	<b>Inibe AChE</b>	<b>Inibe BChE</b>	<b>Acção antioxidante</b>	<b>Referência</b>
<i>S. lavandulaefolia</i>	Óleo essencial 1,8-cineol ( <b>14</b> ) cânfora ( <b>15</b> ) $\alpha$ -pineno ( <b>17</b> )	+	n.t.	n.t.	Perry <i>et al.</i> , 2000
	1,8-cineol ( <b>14</b> ) $\beta$ - e $\alpha$ -pineno ( <b>17</b> )	+	n.t.	+	Perry <i>et al.</i> , 2001
<i>S. officinalis</i> var. <i>purpurea</i>	Óleo essencial	n.t.	+	n.t.	Savelev <i>et al.</i> , 2004
<i>S. fruticosa</i>	Óleo essencial	n.t.	+	n.t.	
<i>S. miltiorrhiza</i>	Extracto em acetona Criptotanchinona ( <b>28</b> ) di-hidrotanchinona ( <b>29</b> )	+	n.t.	n.t.	Ren <i>et al.</i> , 2004
<i>S. officinalis</i>	Extracto em etanol	+	n.t.	+	Ferreira <i>et al.</i> , 2006
	Infusão aquosa	+	n.t.	+	Kulisic-Bilusic <i>et al.</i> , 2008
<i>S. albimaculata</i>	Extracto em éter de petróleo	+	+	+	Orhan <i>et al.</i> , 2007
<i>S. cryptantha</i>		+	+	+	
<i>S. cyanescens</i>	Extracto em clorofórmio	+	+	+	
<i>S. candidissima</i>		+	+	+	
<i>S. ceratophylla</i>		+	+	+	
<i>S. syriaca</i>		+	+	+	
<i>S. frigida</i>		+	+	+	
<i>S. microstegia</i>		+	+	+	
<i>S. santolinifolia</i>	Ácido santolinóico ( <b>30</b> )	+	+	n.t.	Ahmad <i>et al.</i> , 2007
<i>S. leriifolia</i>	Óleo essencial	+	+	+	Loizo <i>et al.</i> , 2009

<i>S. triloba</i>	Extracto em etanol (75%)	+	n.t.	+	Orhan e Aslan, 2009
<i>S. potentillifolia</i>	Óleo essencial	+	+	+	Kivrak <i>et al.</i> , 2009
	$\alpha$ -pineno ( <b>17</b> )	+	+	n.t.	
	$\beta$ -pineno ( <b>31</b> )	-	-	n.t.	
<i>S. poculata</i>	Extracto em metanol	-	+	+	Kolak <i>et al.</i> , 2009
	Ácido ursólico ( <b>22</b> )	+	+	-	
<i>S. fruticosa</i>	Extracto em diclorometano	+	n.t.	+	Senol <i>et al.</i> , 2010

(+) Extracto ou compostos activos; (-) extracto ou compostos não activos; (n.t.) – não testado.

A análise da tabela revela que os extractos ricos em terpenos são potenciais fontes de compostos anticolinesterásicos que tanto podem ser monoterpenos (**14**, **15**, **17** e **31**), como diterpenos (**28** e **29**) ou triterpenos pentacíclicos (**22** e **30**). Apresentam-se a seguir as estruturas dos compostos **28**, **29**, **30** e **31**.



**Figura 12.** Compostos anticolinesterásicos de origem natural.

Em resumo, as plantas do género *Salvia* possuem uma notável diversidade de actividades biológicas com relevância medicinal. Os metabolitos secundários que se encontram nos extractos destas espécies são essencialmente compostos terpénicos e compostos fenólicos. No primeiro grupo salientam-se os monoterpenos dos óleos essenciais e os triterpenos pentacíclicos com a estrutura básica do ursano, do oleanano e do lupano. Topçu destaca como exemplo representativo dos triterpenos pentacíclicos dotados de importantes actividades biológicas, o ácido ursólico (**22**) e o ácido oleanólico (**23**). Os extractos das raízes são, frequentemente, ricos em diterpenos (Topçu, 2006). Os compostos fenólicos incluem flavonóides (Topçu, 2006) e polifenóis derivados do ácido cafeico (Lu e Foo, 2002), dos quais são exemplos representativos de *Salvia* os compostos referidos nesta secção.

### **1.3 *Salvia sclareoides* Brot.**

*Salvia sclareoides* Brot., conhecida como galacrista em certas localidades do Algarve, ou como salva-do sul, é uma planta herbácea, de 45 a 96 cm, perene, com caules simples ou ramificados, folhas simples, inflorescências de dimensão não superior a 45 cm e corola de cor violeta ou violeta azulado. É endémica da flora Ibérica, com preferência pelos solos calcários, sendo possível encontrá-la em diversas regiões da península. Em Portugal, os exemplares desta espécie distribuem-se na zona do Centro Oeste Calcário e Olissiponense, no Centro Sul Arrabidense e no Sudeste e Barrocal Algarvio (Franco, 1994).

Pouco utilizada na medicina caseira, *S. sclareoides* é referida apenas num estudo etnobotânico realizado no Algarve, em 2006, por Joana Rodrigues como planta usada para limpar os olhos, contrariamente à *S. officinalis* que tem uma longa tradição como planta medicinal em Portugal.

Se a espécie *S. officinalis* tem sido intensamente estudada, pouco se sabe de *S. sclareoides*. Mendes e colaboradores publicaram, em 1993, os resultados de



um breve estudo fitoquímico do seu extracto mas nunca foi realizada qualquer pesquisa relativa à sua actividade biológica.

O trabalho agora apresentado foi iniciado no âmbito de um projecto com a BASF cujo objectivo se centrava na investigação da actividade fitotóxica, antifúngica e insecticida do extracto em acetona, a qual foi desenvolvida na Estação de Investigação Agrícola desta empresa em Limburgerhof na Alemanha, bem assim como no isolamento, identificação e caracterização estrutural, por métodos espectroscópicos e físicos, dos constituintes maioritários do mesmo extracto. O estudo fitoquímico foi ainda completado com a análise do seu conteúdo fenólico recentemente efectuada no DQB- FCUL

Posteriormente, na sequência de uma colaboração com a Escola Superior Agrária de Santarém, procedeu-se ao estudo da actividade anticolinesterásica e antioxidante dos extractos em acetona, em etanol, em metanol, em butanol e em água. Os mesmos extractos foram ainda sujeitos a diversos testes com a finalidade de avaliar a sua toxicidade.

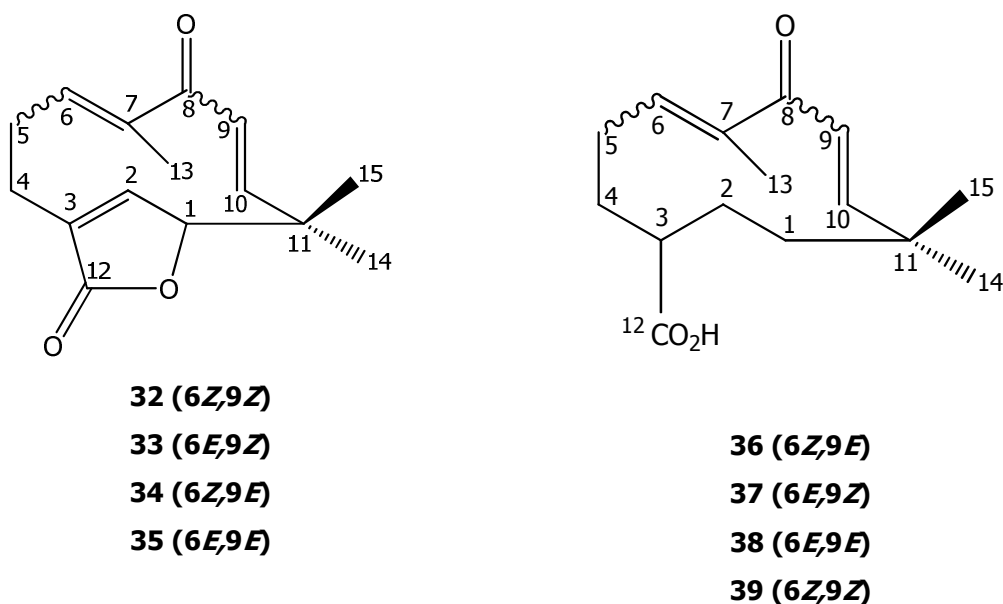
#### **1.4 O género *Asteriscus***

O género *Asteriscus* (família Compositae, tribo Inuleae, subtribo Inulineae) abrange um pequeno número de espécies que se distribuem por toda a região do Mediterrâneo, sendo, no entanto, possível encontrar espécies deste género nos arquipélagos das Canárias e de Cabo Verde.

A revisão da bibliografia disponível sobre este género revela que os extractos destas plantas são constituídos por lactonas sesquiterpénicas, das quais as humulanolidas parecem ser características do género. As primeiras referências a este tipo de compostos foram publicadas por San Feliciano que dirigiu um extenso estudo do extracto de *Asteriscus aquaticus*, na sequência do qual foram isoladas as astericunolidas A (**32**), B (**33**), C (**34**) e D (**35**), que são

lactonas sesquiterpénicas com a estrutura básica do humulano; estes compostos são isómeros que diferem na configuração das ligações duplas (San Feliciano *et al.*, 1882; San Feliciano *et al.*, 1984; San Feliciano *et al.*, 1985a).

O estudo do extracto de *Asteriscus graveolens* conduziu ao isolamento das asteriscunolidas A, B, C e D e à identificação dos ácidos considerados seus precursores, designadamente os ácidos (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**36**), (2*Z*,6*E*,9*Z*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**37**), (2*Z*,6*E*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**38**) e (2*Z*,6*Z*,9*Z*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**39**) (El-Dahmy *et al.*, 1985). Apresenta-se na figura seguinte a estrutura das asteriscunolidas **32**, **33**, **34** e **35** e dos ácidos **36**, **37**, **38** e **39**.

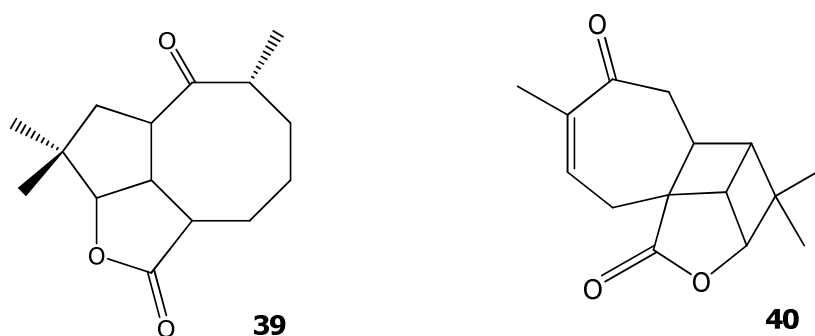


**Figura 13.** Estrutura das asteriscunolidas A, B, C e D e dos seus precursores.

Jakupovic efectuou o estudo fitoquímico da *Asteriscus sericeus* tendo também isolado as quatro astericunolidas (Jakupovic, *et al.*, 1987). O estudo do extracto de *Asteriscus schimperi* conduziu ao isolamento das asteriscunolidas e de outra

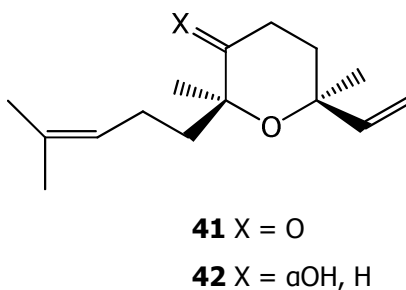
lactona sesquiterpénica do tipo humulanolido que difere das asteriscunolidas por apresentar a ligação 6(7) hidrogenada (Dawidar *et al.*, 2005).

O extracto de *A. aquaticus* contém, além das asteriscunolidas, outras lactonas sesquiterpénicas, a asteriscanolida (**39**) e a aquatolida (**40**), identificadas por San Feliciano (San Feliciano *et al.*, 1985b; San Feliciano *et al.*, 1989). A estrutura dos compostos **39** e **40** está representada na figura 14.



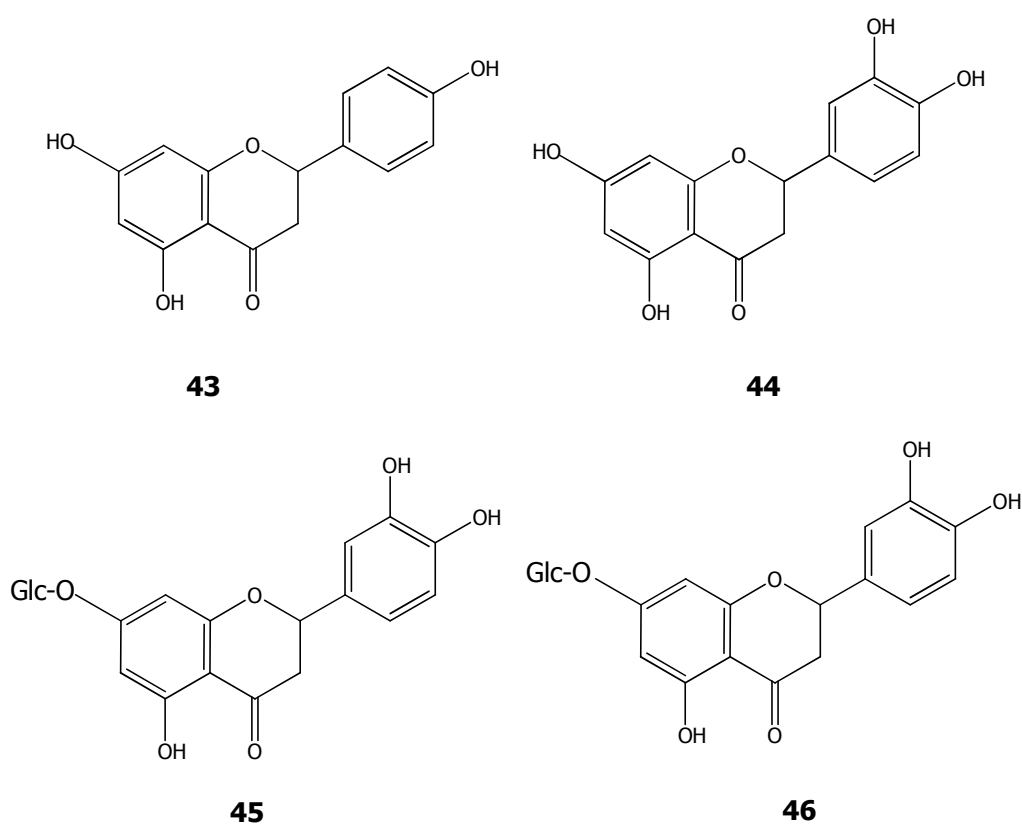
**Figura 14.** Lactonas sesquiterpénicas de *Asteriscus aquaticus*.

Diversos de derivados do farnesol e do timol foram referidos como metabolitos secundários de *A. pygmaeus* (Ahmed, 1992). O extracto de *A. sericeus* possui, além das referidas asteriscunolidas, os derivados do nerolidol 6-Oxociclonerolidol (**41**) e 6 $\alpha$ -Hidroxiciclonerolidol (**42**), descritos por Jakupovic (Jakupovic *et al.*, 1987). Na figura 15 representa-se a sua estrutura.



**Figura 15.** Derivados do nerolidol constituintes de *A. sericeus*.

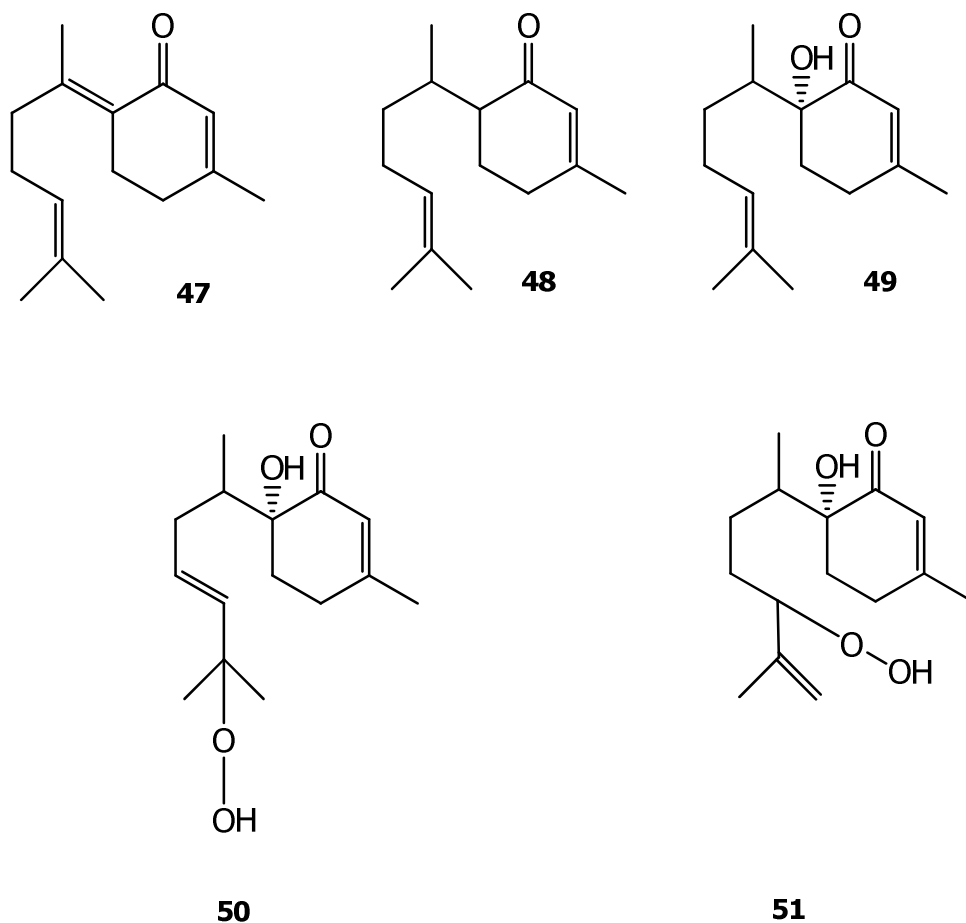
Compostos fenólicos do grupo dos flavonóides foram também descritos por Ahmed como constituintes do extracto de *A. graveolens* (Ahmed *et al.*, 1991) e do extracto de *Asteriscus pygmaeus* (Youssef *et al.*, 1995). Como exemplo podem ser referidos a quercitina (**12**), o canferol (**13**), a apigenina (**43**), a luteolina (**44**), o 7-*O*-glucósido de luteolina (**45**) e o 7-*O*-glucósido de apigenina (**46**). Os quatro últimos compostos estão representados na figura 16.



**Figura 16.** Flavonóides comuns em plantas do género *Asteriscus*.

Derivados do bisaboleno foram isolados do extracto de *A. graveolens* pelo grupo de El-Dahmy e Sarg que reportaram o isolamento de uma bisabolona e de hidroperóxidos de bisabolona.

Na figura 17 representa-se a estrutura dos seguintes compostos: bisabol-2,6,10-trien-1-ona (**47**), bisabol-2,10-dien-1-ona (**48**), 6-hidroxibisabol-2,10-dien-1-ona(**49**) 6-hidroxi-11-peroxibisabol-2,9-dien-1-ona (**50**) e 6-hidroxi-11-peroxibisabol-2,11-dien-1-ona (**51**) (El-Dahmy *et al.*, 1985; Sarg *et al.*, 1994).



**Figura 17.** Derivados do bisaboleno isolados de *A. graveolens*.

Não se encontram muitas referências relativas ao estudo da actividade biológica dos extractos de espécies de *Asteriscus*. Sarg e colaboradores determinaram a actividade antimicrobiana e hipoglicemiante do extracto de *A. graveolens* e citaram a actividade antitumoral, anti-espasmódica e anti-inflamatória de plantas deste género (Sarg *et al.*, 1994). Um outro estudo da actividade

antimicrobiana de *A. graveolens* foi realizado por Abutbul que determinou o efeito do extracto aquoso desta planta em bactérias responsáveis por infecções de espécies piscícolas não tendo obtido, no entanto, bons resultados (Abutbul *et al.*, 2005). No que respeita à actividade antitumoral, foi recentemente investigada a acção da asteriscunolida A em linhas celulares da leucemia (HL-60 e U937) e do melanoma (SK-MEL-1) com vista ao estabelecimento, quer do seu efeito antiproliferativo, quer do seu mecanismo de acção (Negrin *et al.*, 2010). Os resultados obtidos demonstraram que este composto tem uma actividade significativa, induzindo a apoptose de células tumorais das linhagens referidas.

O presente trabalho, inserido no projecto com a BASF, já referido a propósito de *S. sclareoides*, descreve os resultados dos estudos de actividade fitotóxica, antifúngica e insecticida do extracto em clorofórmio e de diversas fracções de *Asteriscus vogelii* (Webb.) Walp. tal como dos compostos maioritários isolados das fracções bioactivas.

No âmbito de uma colaboração com PharmaMar e a Universidade de Salamanca, os compostos isolados foram avaliados quanto ao efeito antitumoral em linhas celulares do carcinoma do pulmão humano (A-549), do carcinoma do cólon humano (HT-29), do melanoma humano (MEL-28) e do linfoma P-338 de ratinhos. Os resultados aqui apresentados constituem o único estudo publicado até ao momento relativamente a esta espécie, colhida na ilha de Santiago em Cabo Verde.

## **2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**





## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Introdução

Nesta secção são apresentados os resultados relativos ao estudo fitoquímico e à determinação da actividade fitotóxica, antifúngica e insecticida do extracto em acetona de *S. sclareoides*. São também analisados os resultados do estudo da acção anticolinesterásica e antioxidante de diversos extractos de *S. sclareoides* (acetona, etanol, metanol, butanol e água), bem como a sua eventual relação com os constituintes maioritários do extracto em acetona e com o conteúdo total em fenóis, respectivamente. Discutem-se ainda os resultados dos testes de toxicidade realizados com os mesmos extractos.

No que respeita à planta *A. vogelii*, são discutidas as estruturas dos compostos maioritários isolados das fracções com actividade biológica significativa (acção fitotóxica, em particular) e apresentados os resultados obtidos através do estudo das actividades fitotóxica, antifúngica e insecticida do extracto em clorofórmio e de várias fracções deste mesmo extracto. A pesquisa da actividade biológica desta planta foi complementada com testes de actividade fitotóxica e actividade antitumoral realizados com os compostos puros isolados das fracções biologicamente activas.

O método de pesquisa da actividade fitotóxica inicia-se com um conjunto de ensaios realizados numa estufa com plantas jovens completas, que são pulverizadas com soluções dos compostos estudados. Estes ensaios, por serem realizados com plantas completas, podem originar resultados falsamente negativos, ou seja, os produtos testados não manifestarem qualquer acção fitotóxica, não por serem biologicamente inactivos, mas por não serem transportados até às células onde actuam. De facto, em plantas completas constata-se por vezes a existência de dificuldades de absorção pela raiz, quer por incapacidade de retirar compostos do meio, quer pela retenção de

substâncias nas células da endoderme, que constitui uma estrutura selectiva de grande importância no controlo de solutos transferidos para o cilindro central. Outro impedimento à actuação dos compostos resulta da dificuldade de translocação através do xilema. Assim, procede-se também à realização de um segundo conjunto de experiências com quatro organismos diferentes, cujas características permitem ultrapassar estas dificuldades e verificar se os extractos, fracções ou compostos testados possuem ou não acção fitotóxica. São utilizadas plantas completas de azola (feto aquático *Azolla filiculoides*) e de lentilha-d'água (*Lemna paucicostata*), parte aérea de plântulas de mostarda branca (*Sinapis alba*) e algas unicelulares pertencentes à espécie *Scenedesmus acutus*. Os organismos referidos absorvem os nutrientes de um meio de cultura líquido ao qual são adicionadas as substâncias a testar.

A azola e a lentilha-d'água são plantas aquáticas constituídas por raiz e folhas, em que as raízes ficam submersas e as folhas se mantêm à superfície da água. Na lentilha-d'água a absorção é efectuada pela raiz e também pelas folhas, as quais não possuem cutícula na página inferior, o que facilita a tomada de nutrientes e permite ultrapassar eventuais dificuldades de absorção pela raiz ou de transporte através do xilema. No ensaio realizado com plântulas de mostarda não se verificam impedimentos à absorção devidos à presença da raiz, dado que a tomada de substâncias se faz directamente pelo xilema. Quanto às algas, sendo organismos unicelulares, não apresentam problemas de absorção ou de translocação, uma vez que todo o organismo se encontra em contacto com o meio de cultura, podendo retirar dele os compostos que se encontram em solução ou em suspensão.

O critério de avaliação dos extractos e das fracções quanto à sua actividade fitotóxica baseia-se na quantificação da inibição do crescimento e assenta numa escala de três níveis: para as concentrações usadas, considera-se média uma inibição superior a 90%. No entanto este valor tem que ser observado para se efectuarem os testes com soluções mais diluídas. Uma inibição situada entre 50 e 90% é considerada fraca conquanto o mesmo valor obtido com soluções 100

vezes mais diluídas seja considerado bom. O parâmetro escolhido para determinar os resultados foi o crescimento total, tomando o controlo como padrão de comparação, ao qual corresponde um crescimento de 100%. Os valores obtidos traduzem então a actividade biológica dos extractos, fracções ou compostos em termos de percentagem de inibição do crescimento.

Foi também investigada a possibilidade das plantas em estudo sintetizarem compostos capazes de actuar como fungicidas com potencial aplicação no combate a fungos fitopatogénicos, nomeadamente, *Botrytis cinerea* e *Pyricularia oryzae*, que infestam diversas culturas de grande valor económico, *Fusarium culmorum* e *Erysiphe graminis* subsp. *tritici*, responsáveis por prejuízos significativos em colheitas de trigo.

A quantificação da acção antifúngica, determinada em percentagem de inibição do crescimento, foi feita por comparação com a acção de padrões comerciais que inibem total ou quase totalmente (95 –100%) o crescimento dos fungos mencionados. Assim, qualquer extracto, fracção ou composto que não produza resultados idênticos aos dos padrões, não é considerado suficientemente activo para se proceder ao estudo da sua possível aplicação industrial.

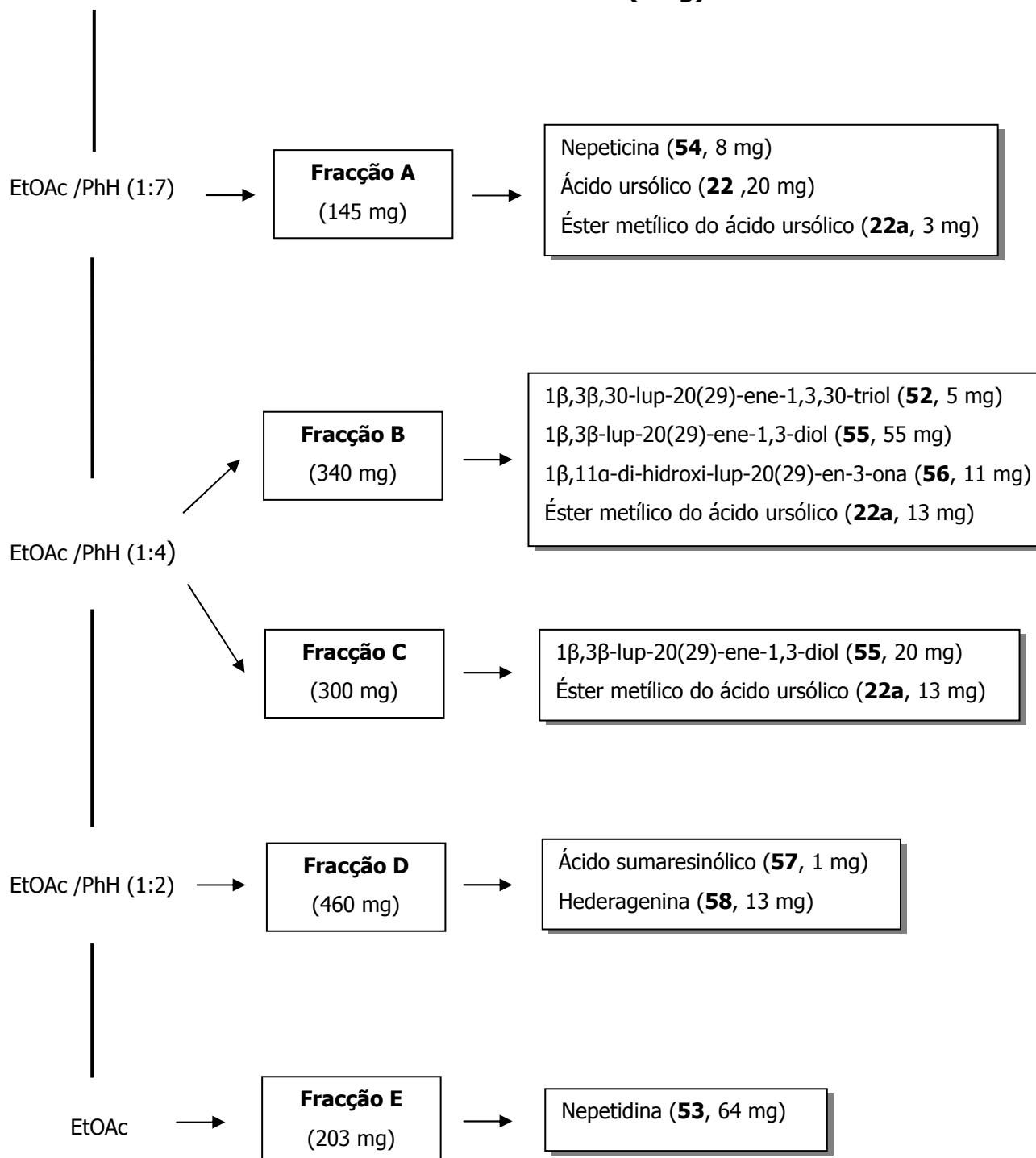
## 2.2 Fitoquímica e actividade biológica de *S. sclareoides*

### 2.2.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados do extracto em acetona

O fraccionamento do extracto em acetona de *S. sclareoides*, representado de forma muito simplificada no esquema 1, permitiu o isolamento de um composto novo caracterizado como 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene 1,3,30-triol (**52**). Foram também isolados a nepetidina (**53**), a nepeticina (**54**), o 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**), a 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**56**), o ácido ursólico (**22**), o ácido sumaresinólico (**57**) e a hederagenina (**58**). Os compostos **52**, **53**, **54**, **56**, **57** e **58** foram identificados pela primeira vez como constituintes

do extracto de *S. sclareoides* e os compostos **53** e **57** são descritos pela primeira vez como metabolitos secundários de uma espécie de *Salvia*.

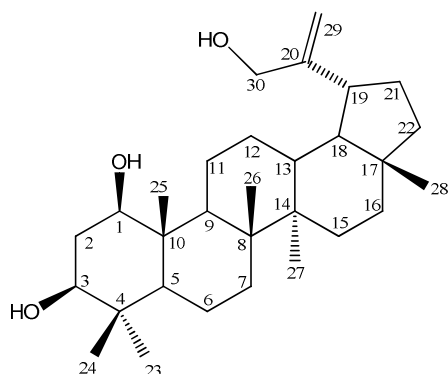
### EXTRACTO EM ACETONA DE *Salvia sclareoides* (11 g)



**Esquema 1.** Fraccionamento do extracto em acetona e constituintes maioritários das fracções principais.

### 2.2.1.1 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (52)

Este composto foi isolado na forma de agulhas incolores com o intervalo de fusão de 276-278 °C. A sua estrutura pode ser observada na figura seguinte.



**Figura 18.** Estrutura de 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol.

No espectro de IV aparecem as bandas características dos grupos hidroxilo ( $3600\text{ cm}^{-1}$ ) e da ligação dupla do isopropenilo ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ).

No espectro de massa são observáveis os picos correspondentes aos fragmentos resultantes da perda de uma e de duas moléculas de água ( $m/z$  440 e 422, respectivamente) e a  $m/z$  406 surge um fragmento resultante da perda de uma molécula de água e de um grupo metilo a partir do fragmento  $[M-H]^+$ .

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (tabela 5) apresenta singletos a  $\delta$  0,73, 0,77, 0,89, e 1,04 correspondentes a quatro grupos metilo e um outro a  $\delta$  0,93 que integra seis prótons. Os sinais correspondentes aos prótons H-30 $\alpha,\beta$  aparecem na forma de um sistema ABX a  $\delta$  4,06, 4,10, 4,11, 4,15 com uma constante de acoplamento  $J_{30\alpha,30\beta}$  14.6 Hz e  $J_{30,29b}$  0,7 Hz. O grupo metileno H-29a,b é identificado pelo duplete a  $\delta$  4,92 (H-29b) e pelo singlete a  $\delta$  4,90 (H-29a).

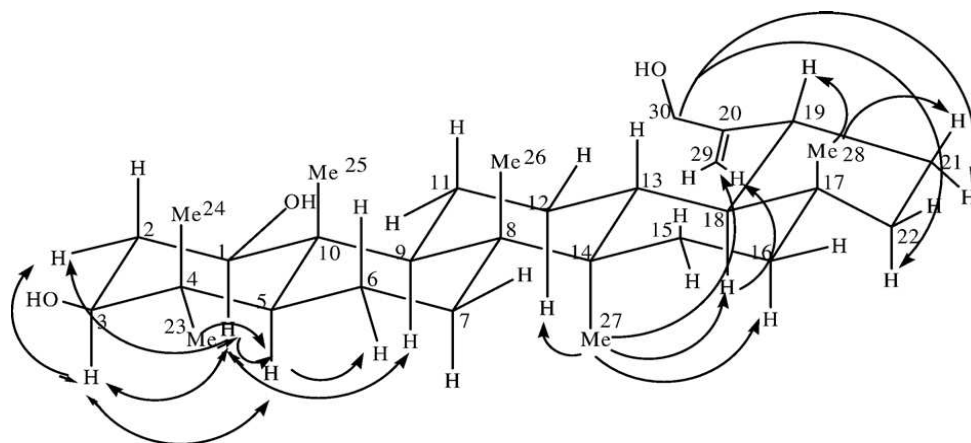
**Tabela 5.** Dados de  $^1\text{H}$ -NMR e  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hertz) do composto **52** e correlações HMBC relevantes para a sua elucidação estrutural.

C	$^{13}\text{C}$ -NMR	$^1\text{H}$ -NMR	Correlações HMBC
1	79,02	3,43 <i>dd</i> ( $J_{1,2\alpha}=4,6$ ; $J_{1,2\beta}=11,2$ ) (H-1 $\alpha$ )	Me-25
2	38,07	1,83 <i>td</i> ( $J_{2\alpha,2\beta}=12,7$ ) (H-2 $\alpha$ ), 1,66-1,24 <i>m</i> (H-2 $\beta$ )	-
3	75,70	3,24 <i>dd</i> ( $J_{2\alpha,3\alpha}=4,4$ ; $J_{2\beta,3\alpha}=12,1$ ) (H-3 $\alpha$ )	Me-23, Me-24
4	38,86	-	Me-23, Me-24
5	53,06	0,58 <i>dd</i> ( $J_{5,6\alpha}=2,3$ ; $J_{5,6\beta}=11,1$ )	Me-23, Me-24
6	17,94	1,66-1,24 <i>m</i>	-
7	34,10	1,66-1,24 <i>m</i>	Me-26
8	41,35	-	Me-26
9	51,39	1,66-1,24 <i>m</i>	Me-25, Me-26
10	43,40	-	Me-25
11	23,84	1,66-1,24 <i>m</i>	-
12	26,64	0,97-1,03 <i>m</i> (H-12 $\alpha$ ), 1,66-1,24 <i>m</i> (H-12 $\beta$ )	-
13	37,54	1,66-1,24 <i>m</i>	-
14	42,92	-	Me-27
15	27,46	1,66-1,24 <i>m</i>	Me-27
16	35,48	1,18-1,14 <i>m</i> (H-16 $\alpha$ ), 1,66-1,24 <i>m</i> (H-16 $\beta$ )	Me-28
17	42,92	-	Me-28
18	48,98	1,66-1,24 <i>m</i>	Me-28
19	43,82	2,29 <i>td</i> ( $J_{19,21\alpha}=J_{18,19}=11,52$ ; $J_{19,21\beta}=5,56$ )	H-30a,b
20	154,73	-	H-18, H-21, H-29a,b
21	29,68	1,99-2,11 <i>m</i> (H-21 $\beta$ ), 2,23-2,15 <i>m</i> (H-21 $\alpha$ )	-
22	39,83	1,66-1,24 <i>m</i>	Me-28
23	27,84	0,93 <i>s</i>	H-3, H-5, Me-24
24	14,93	0,73 <i>s</i>	H-3, H-5, Me-23
25	11,88	0,89 <i>s</i>	-
26	16,23	1,04 <i>s</i>	-
27	14,42	0,93 <i>s</i>	-
28	17,73	0,77 <i>s</i>	-
29	107,02	4,90 <i>s</i> (H-29a), 4,92 <i>d</i> ( $J=0,7$ ) (H-29b)	H-30a,b
30	65,04	4,06, 4,10, 4,11, 4,15 Sistema ABX ( $J_{AB}=14,6$ ) (H-30a,b)	H-29a,b

Os dubletos duplos a  $\delta$  3,24 e  $\delta$  3,43 correspondem aos prótons H-3 $\alpha$  e H-1 $\alpha$ . Os desvios químicos observados e as respectivas constantes de acoplamento ( $\delta$  3,24,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 4,4$  Hz,  $J_{2\beta,3\alpha} = 12,1$  Hz e  $\delta$  3,41,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 4,6$  Hz,  $J_{1\alpha,2\beta} = 11,2$  Hz) estão de acordo com os valores descritos para os lupenos com ligação dupla 20(29) e com grupos hidroxilo nas posições 1 $\beta$ ,3 $\beta$  (Savona *et al.*, 1987). A presença de uma ligação dupla 20(29) é confirmada pelos sinais a  $\delta$  107,02 e

$\delta$  154,73 no espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR, que apresenta ainda os sinais a  $\delta$  65,04, 75,70 e 79,02 correspondentes a C-30 (hidroximetilo) e aos átomos de carbono ligados aos grupos hidroxilo nas posições 3 $\beta$  e 1 $\beta$ , respectivamente, atribuídos por HMQC. A presença do hidroximetilo na posição C-30 é confirmada por meio da correlação bidimensional (HMBC, tabela 5) entre H-30 $\alpha,\beta$  e C-29 a  $\delta$  107,02 e entre H-29a e H-29b e C-30 a  $\delta$  65,04. Os prótons H-30 $\alpha,\beta$  apresentam ainda uma correlação com C-19 a  $\delta$  43,82 que aparece nos lupenos geralmente a  $\delta$  48,0 (Savona *et al.*, 1987). São observadas as correlações entre C-25 e H-1 $\alpha$  e entre C-23 e C-24 e H-3 $\alpha$ , bem como as correlações entre os átomos de carbono quaternários C-4, C-8, C-10, C-14 e C-17 e os grupos metilo que a eles se ligam (tabela 5).

Os restantes sinais de  $^1\text{H}$ -NMR foram atribuídos pelos dados de NOESY, COSY e HMQC, sendo as correlações de NOESY representadas na figura 19 as mais relevantes para confirmar a atribuição dos sinais correspondentes aos prótons H-5, H-9, H-13, H-18, H-19, bem como a sua orientação  $\alpha$  ou  $\beta$  e também dos sinais de H-29a,b.

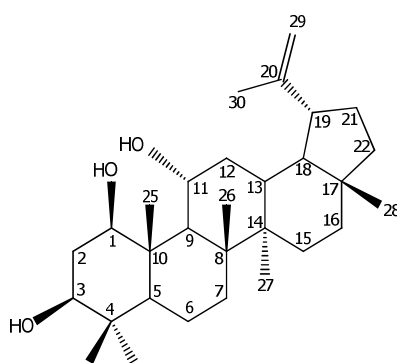


**Figura 19.** Correlações de NOESY do composto **52**.

Os dados espectroscópicos permitem atribuir ao composto **52** a estrutura do 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (figura 18).

### 2.2.1.2 Nepetidina [1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-1,3,11-triol, 53]

O composto **53** (figura 20) foi isolado na forma de agulhas incolores e o seu ponto de fusão é de 290 °C. O espectro de IV apresenta uma banda a 3584 cm<sup>-1</sup> correspondente a um grupo hidroxilo e duas bandas a 1642 e 890 cm<sup>-1</sup> características do grupo isopropenilo nos lupenos com uma ligação dupla 20(29) (Ahmad *et al.*, 1982).



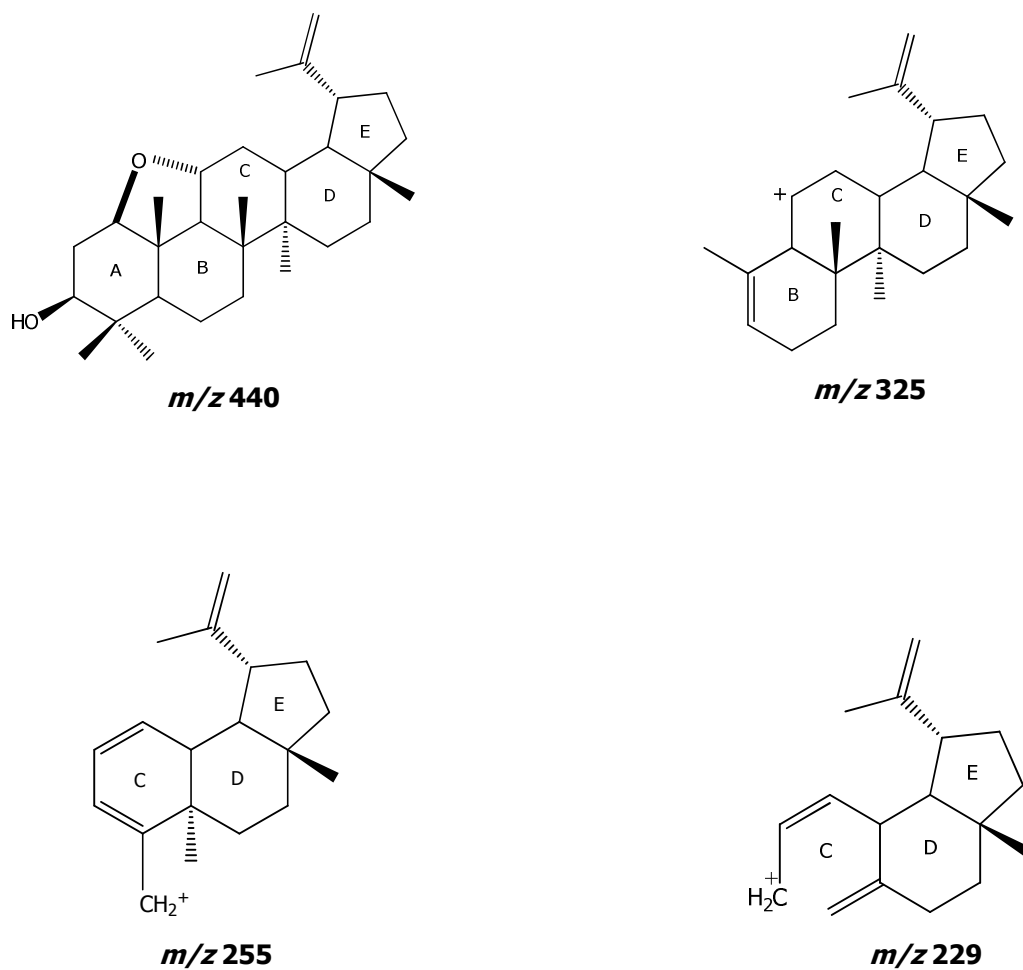
**Figura 20.** Estrutura da nepetidina.

O espectro de massa apresenta o pico molecular a  $m/z$  458 ao qual corresponde a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> e os sinais correspondentes à perda de uma molécula de água ( $m/z$  440), de uma molécula de água e um grupo metilo ( $m/z$  425) e de três moléculas de água e um grupo metilo ( $m/z$  389). O fragmento a  $m/z$  440 perde o anel A com dois grupos hidroxilo, dando origem ao pico base a  $m/z$  325 representado na figura 21 (Ahmad *et al.*, 1982). Outros picos significativos aparecem a  $m/z$  255, 229, 217, 203, 189 e 175, mostrando, os dois últimos, que não existe substituição nos anéis D ou E (Ahmad *et al.*, 1982).

No espectro de <sup>1</sup>H-NMR observam-se os sinais característicos dos lupenos com uma ligação dupla 20(29): dois singletos largos a  $\delta$  4,54 e  $\delta$  4,66 correspondentes à ligação dupla 20(29), singletos situados entre  $\delta$  0,93 e  $\delta$  0,70 atribuídos a seis grupos metilo e um singlete a  $\delta$  1,62 originado pelo grupo



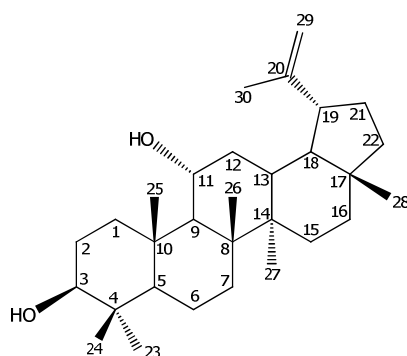
metilo vinílico (Me-30). Os sinais a  $\delta$  3,85,  $\delta$  3,45 e  $\delta$  3,17 são atribuídos aos prótons H-11 $\beta$ , H-1 $\alpha$  e H-3 $\alpha$ , podendo assim concluir-se que a substituição nas posições referidas é OH-11 $\alpha$ , OH-1 $\beta$  e OH-3 $\beta$ . Os dados espectroscópicos deste composto correspondem aos da nepetidina isolada de *Nepeta hindostana* e caracterizada por Ahmad *et al.*, (1982).



**Figura 21.** Fragmentos do espectro de massa da nepetidina.

### 2.2.1.3 Nepeticina [ $3\beta,11\alpha$ -lup-20(29)-ene-3,11-diol , 54]

O composto **54** (figura 22) foi isolado na forma de agulhas incolores e o seu ponto de fusão é de  $215^{\circ}\text{C}$ . No espectro de IV aparece a banda do grupo hidroxilo a  $3640\text{ cm}^{-1}$  e as bandas do grupo isopropenilo a  $1640$  e  $885\text{ cm}^{-1}$ .

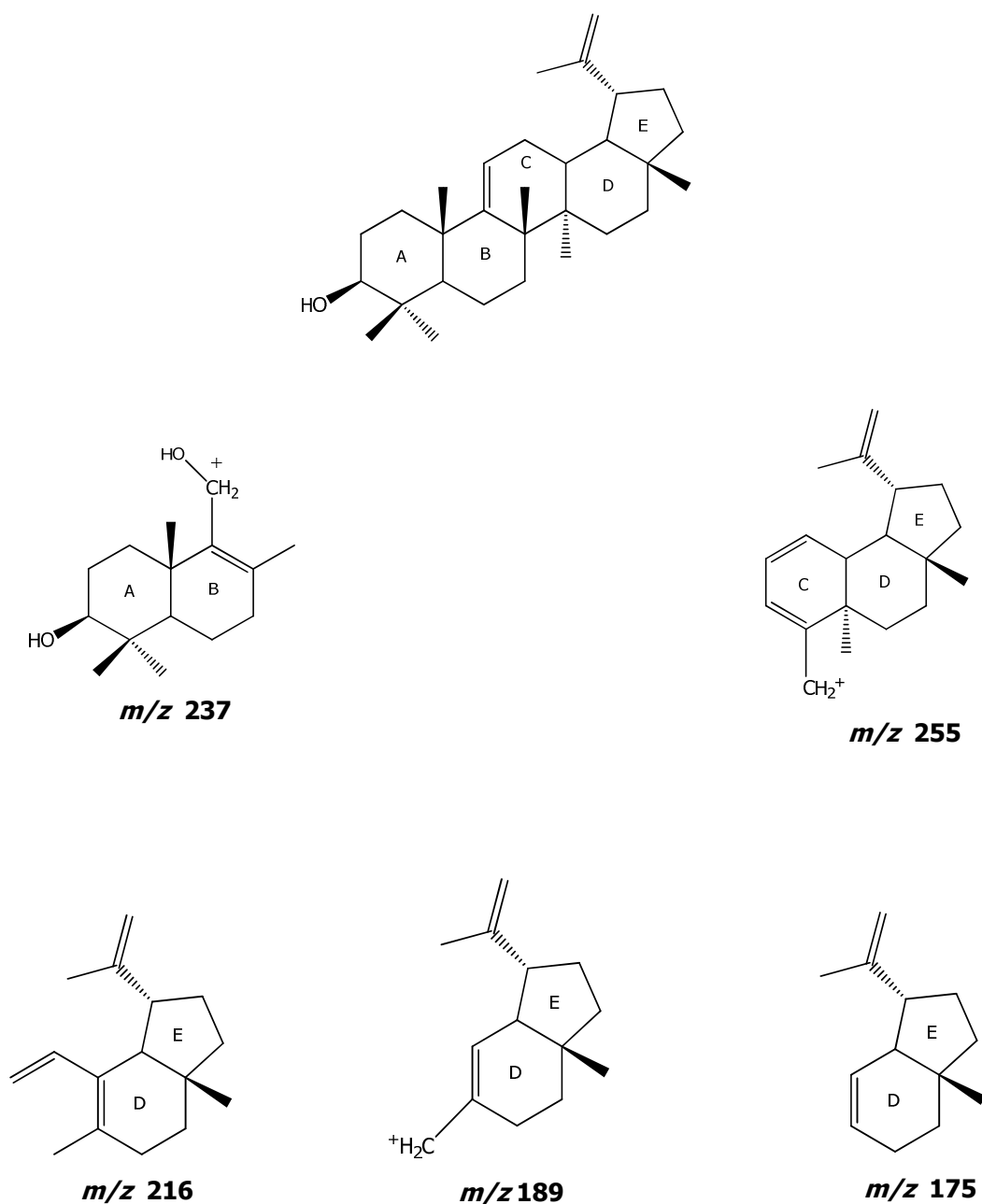


**Figura 22.** Estrutura da nepeticina

O espectro de massa apresenta o pico molecular a  $m/z$  442, o que corresponde a uma fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ , e o pico base a  $m/z$  424 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ). Um pico observado a  $m/z$  406 é atribuído à perda de duas moléculas de água. A perda de uma ou de duas moléculas de água e um grupo metilo origina os picos a  $m/z$  409 e  $m/z$  391, respectivamente. Observam-se ainda os fragmentos característicos da nepeticina a  $m/z$  255, 237, 203, 216, 189 e 175, cuja estrutura, proposta por Ahmad *et al.* (1981), se encontra esquematizada na figura 23.

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  apresenta os sinais característicos dos lupenos com ligação dupla 20(29): dois singletos  $\delta$  4,58 e  $\delta$  4,71 originados pelos portões H-29a e H-29b, singletos entre  $\delta$  1,03 e  $\delta$  0,78 correspondentes a seis grupos metilo e um singlete a  $\delta$  1,66 atribuído ao metilo vinílico (Me-30). O triplo dubleto a  $\delta$  3,94 corresponde ao próton H-11 $\beta$  e o sinal do próton H-3 $\alpha$  aparece

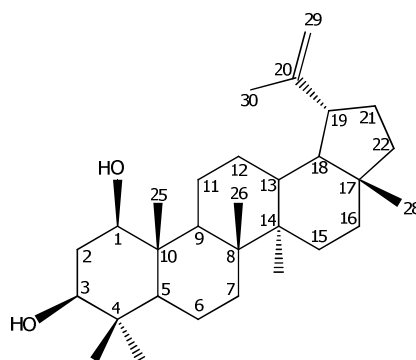
na forma de tripleto a  $\delta$  3,20, com uma constante de acoplamento  $J$  de 8,0 Hz, significando isto que os grupos hidroxilo se encontram nas posições 11 $\alpha$  e 3 $\beta$ . O triplo dubleto observado a  $\delta$  2,38 é atribuído ao próton H-13 $\beta$ . Assim, é possível atribuir ao composto **54** a estrutura do 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-3,11-diol uma vez que os seus dados espectroscópicos são idênticos aos descritos na literatura para a nepeticina isolada de *Nepeta hindostana* (Ahmad *et al.*, 1981).



**Figura 23.** Fragmentos do espectro de massa da nepeticina.

#### 2.2.1.4 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**)

O composto **55** (figura 24) foi isolado na forma de agulhas incolores e o seu ponto de fusão é de 249-251 °C. O espectro de IV apresenta as bandas correspondentes aos grupos hidroxilo (3570 cm<sup>-1</sup>) e isopropenilo (1600, 886 cm<sup>-1</sup>).



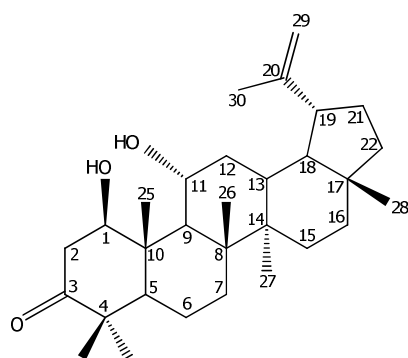
**Figura 24.** Estrutura de 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol.

A análise do espectro de massa revela um pico molecular a  $m/z$  442, correspondente à fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, e os sinais correspondentes à perda de uma molécula de água ( $m/z$  424) e de uma molécula de água e um grupo metilo ( $m/z$  427), assim como os fragmentos a  $m/z$  257, 229, 219, 189, 121, 109 e 43 (pico base) idênticos aos descritos para este composto por Savona *et al.* (1987).

No espectro de <sup>1</sup>H-NMR observam-se dois singletos a  $\delta$  4,45 e  $\delta$  4,51 correspondentes à ligação dupla 20(29). Os dubletos duplos a  $\delta$  3,36 e  $\delta$  3,18 são atribuídos aos prótons H-1 $\alpha$  e H-3 $\alpha$ , respectivamente, sendo as constantes de acoplamento as esperadas nos lupenos com substituição OH-1 $\beta$  e OH-3 $\beta$ . Seis grupos metilo originam singletos situados entre 0,97 e 0,68 ppm e o grupo metilo vinílico (Me-30) é identificado pelo singlete a  $\delta$  1,68. A comparação dos dados espectroscópicos do composto **55** com os dados da literatura permite identificá-lo como o 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol (Savona *et al.*, 1987).

### 2.2.1.5 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (56)

O composto **56** (figura 25) foi isolado na forma de pó amorfo e o seu ponto de fusão é de 234-237 °C. O espectro de IV apresenta as bandas correspondentes aos grupos hidroxilo (3300 cm<sup>-1</sup>) e isopropenilo (1640, 895 cm<sup>-1</sup>).



**Figura 25.** Estrutura de 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

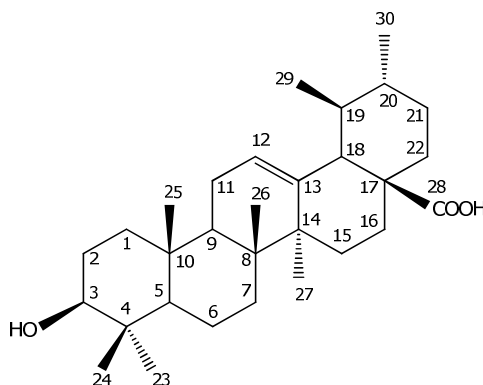
O espectro de massa apresenta o pico molecular a  $m/z$  456, correspondente à fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, os sinais correspondentes à perda de uma molécula de água ( $m/z$  438) e de uma molécula de água e um grupo metilo ( $m/z$  423). O pico base surge a  $m/z$  219.

A análise do espectro de <sup>1</sup>H-NMR permite inferir a presença de uma ligação dupla 20(29) a partir dos dubletos a  $\delta$  4,73 e  $\delta$  4,60 com uma constante de acoplamento  $J$  de 1,8 Hz. Os sinais a  $\delta$  4,08 e  $\delta$  3,88 são atribuídos aos prótons H-3 $\alpha$  e H-11 $\beta$ , respectivamente. Os prótons geminais H-2 $\alpha$  e H-2 $\beta$  originam dois dubletos duplos a  $\delta$  2,21 e  $\delta$  3,02, com uma constante de acoplamento  $J_{2\alpha,2\beta}$  de 13,6 Hz. O sinal do próton H-13 $\beta$  aparece na forma de tripleto duplo a  $\delta$  2,40 e o multipletto situado a  $\delta$  2,02 corresponde ao próton H-12 $\beta$ . Os singletos observados entre 0,79 e 1,08 ppm são atribuídos a seis grupos metilo e o grupo metilo vinílico (Me-30) é identificado pelo singletto a  $\delta$  1,70. Todos os dados

espectroscópicos deste composto, nomeadamente, os desvios químicos do espectro de  $^1\text{H-NMR}$ , a multiplicidade dos sinais e respectivas constantes de acoplamento, são concordantes com os dados publicados por Savona *et al.* (1987) para o composto  $1\beta,11\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

#### 2.2.1.6 Ácido ursólico (ácido $3\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-óico, 22)

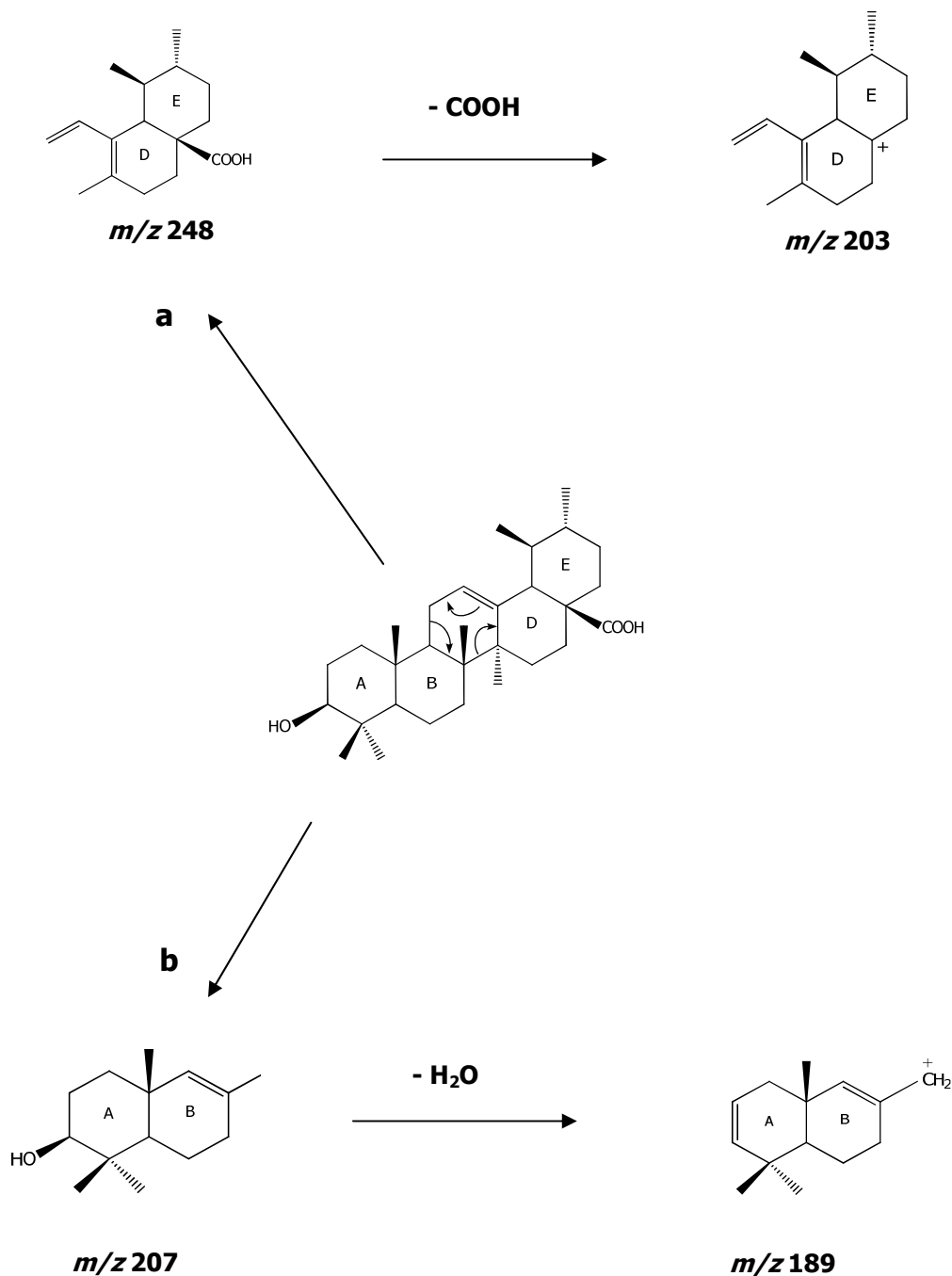
O ácido ursólico (figura 26) foi isolado como um pó amorfo e o seu ponto de fusão é de 289-292 °C. No espectro de IV aparecem os desvios correspondentes ao grupo hidroxilo ( $3416\text{ cm}^{-1}$ ), ao grupo carbonilo ( $1694\text{ cm}^{-1}$ ) e à ligação dupla ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 26.** Estrutura do ácido ursólico.

O espectro de massa sugere a estrutura de um triterpeno derivado do urseno ou do oleaneno com uma ligação dupla em C-12 devido à presença de dois picos muito intensos a  $m/z$  248 (pico base) e a  $m/z$  203 (32%). Nestes compostos ocorre uma fragmentação retro Diels-Alder, da qual resultam os fragmentos **a** e **b** representados no esquema 2 (Budzikiewicz *et al.*, 1963 A25). O fragmento **a** é indicativo da presença de um carboxilo nos anéis C ou D e o pico a  $m/z$  203 corresponde à perda do grupo carboxílico  $[248-\text{COOH}]^+$  (Sakakibara *et al.*, 1983; Ikuta e Itokawa, 1986). O sinal registado a  $m/z$  207 representa o fragmento resultante dos anéis A/B (**b**) que, após desidratação, origina o fragmento detectado a  $m/z$  189 (Ikuta e Itokawa, 1986). De acordo

com Budzikiewicz *et al.* (1963) estes dois fragmentos apontam a presença de um grupo hidroxilo num dos anéis A ou B. O pico molecular a  $m/z$  456 está de acordo com esta estrutura à qual corresponde uma fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ .



**Esquema 2.** Fragmentação da molécula de ácido ursólico.

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  apresenta o sinal com o desvio típico do próton H-12 nos triterpenos derivados do urseno ou do oleaneno e um dubleto duplo a  $\delta$  3,24 que é atribuído ao próton H-3 $\alpha$ . São observados os singletos correspondentes a cinco grupos metilo a  $\delta$  0,78, 0,99, 1,08 e 1,25, este último integrando seis prótons e os dubletos a  $\delta$  0,86 e  $\delta$  0,94 ( $J = 6,6$  Hz), típicos dos grupos metilo nas posições C-29 e C-30 nos ursenos (Furyua *et al.*, 1987; Kojima *et al.*, 1987). Todos os dados espectroscópicos do composto em estudo são idênticos aos descritos na literatura para o ácido ursólico (Kolak *et al.*, 2009; Leipold *et al.*, 2010; Lacikova *et al.*, 2010).

O ácido ursólico foi também isolado na forma do seu éster metílico (**22a**), identificado por meio de dados espectroscópicos. O seu espectro de  $^1\text{H-NMR}$  distingue-se do espectro do ácido ursólico pela presença de um singlete a  $\delta$  3,62 correspondente ao grupo O-CH<sub>3</sub>. No espectro de massa destacam-se dois picos a  $m/z$  262 e  $m/z$  203 (pico base) resultantes da fragmentação retro Diels-Alder. O fragmento a  $m/z$  262 confirma a substituição no anel D. Os dados espectroscópicos do composto **22a** são apresentados conjuntamente com os dados do ácido ursólico.

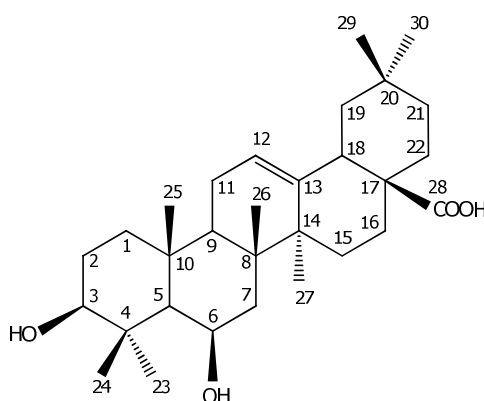
#### **2.2.1.7 Ácido sumaresinólico (ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -di-hidroiolean-12-en-28-óico, 57)**

O ácido sumaresinólico (figura 27) foi isolado como um pó amorfo e tem um ponto de fusão de 298-299  $^{\circ}\text{C}$ . No espectro de IV observam-se as bandas típicas de um grupo hidroxilo (3508  $\text{cm}^{-1}$ ), de uma ligação dupla (2944, 1605  $\text{cm}^{-1}$ ) e de um grupo carboxílico (1731  $\text{cm}^{-1}$ ).

No espectro de massa aparecem os sinais correspondentes aos fragmentos típicos dos oleanenos e dos ursenos com uma ligação dupla em C-12 e com um grupo COOH nos anéis C/D, designadamente, o pico base a  $m/z$  248 resultante fragmentação retro Diels-Alder e o pico de intensidade significativa a



$m/z$  203 (41%). A decomposição do fragmento correspondente a este sinal origina os fragmentos a  $m/z$  189 e  $m/z$  133 (Budzikiewicz *et al.*, 1963). Observa-se ainda um fragmento a  $m/z$  224 que pode ser atribuído, segundo Aimi *et al.* (1989), ao fragmento constituído pelos anéis A/B com dois grupos hidroxilo. O pico molecular a  $m/z$  472 é concordante com a estrutura proposta à qual corresponde a fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_4$ .

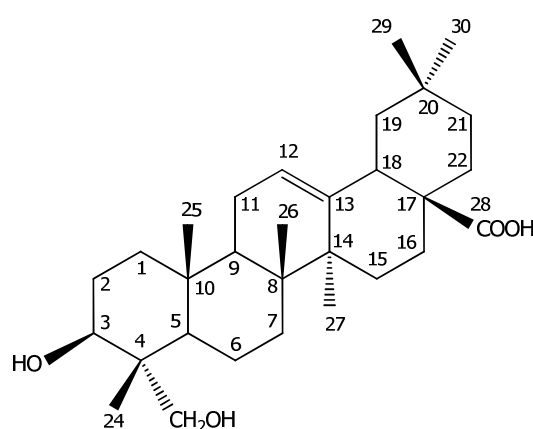


**Figura 27.** Estrutura do ácido sumaresinólico.

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  apresenta sinais característicos dos derivados do oleaneno: seis singletos entre  $\delta$  1,25 e  $\delta$  0,90, correspondentes a sete grupos metilo e um dubleto duplo a  $\delta$  2,85 atribuível ao próton H-18 (Furuya *et al.*, 1987; Kojima *et al.*, 1987). O singlete largo a  $\delta$  4,55 e o dubleto duplo  $\delta$  3,15 têm o desvio típico de prótons H-6 $\alpha$  e H-3 $\alpha$ , registados em triterpenos com grupos hidroxilo nas posições 3 $\beta$  e 6 $\beta$  (Sakakibara *et al.*, 1983; Sakakibara *et al.*, 1984; Kojima *et al.*, 1987; Aimi *et al.*, 1989). A existência de uma ligação dupla em C-12 é confirmada pelo tripleto a  $\delta$  5,34 com a constante de acoplamento  $J$  de 3,0 Hz (Aimi *et al.*, 1989; Sashida *et al.*, 1992). Por comparação dos dados espectroscópicos deste composto com os valores descritos na literatura citada é possível atribuir-lhe a estrutura do ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -di-hidroiolean-12-en-28-óico.

### 2.2.1.8 Hederagenina (ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroiolean-12-en-28-óico, 58)

A hederagenina (figura 28) foi isolada na forma de pó amorfo e tem um ponto de fusão de 334 °C. No espectro de IV aparecem os sinais correspondentes a um grupo hidroxilo (3508 cm<sup>-1</sup>), a uma ligação dupla (1604 cm<sup>-1</sup>) e a um grupo carboxílico (1730 cm<sup>-1</sup>).



**Figura 28.** Estrutura da hederagenina.

O espectro de massa, à semelhança do verificado no ácido ursólico e no ácido sumaresinólico, apresenta dois picos muito intensos a  $m/z$  248 (100%) e  $m/z$  203 (54%), sugerindo a estrutura de um derivado do oleaneno ou do urseno com ligação dupla em C-12 e com um substituinte COOH nos anéis D/E (Budzikiewicz *et al.*, 1963). Aparecem também os sinais já observados no espectro do ácido sumaresinólico a  $m/z$  224, 189 e 133. O pico molecular M<sup>+</sup> a  $m/z$  472 sugere a presença de dois grupos hidroxilo, sendo concordante com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>.

No espectro de <sup>1</sup>H-NMR aparecem os sinais característicos dos derivados do oleaneno: os grupos metilo originam apenas singletos e o próton H-18 é

identificado pelo dubleto duplo a  $\delta$  2,85 (Furuya *et al.*, 1987). A ligação dupla em C-12 é confirmada pelo tripleto a  $\delta$  5.21, com uma constante  $J$  de 4,0 Hz (Furuya *et al.*, 1987; Kojima *et al.*, 1987) e a substituição em C-3 é inferida a partir do tripleto com o desvio de  $\delta$  3,27, com uma constante de acoplamento  $J$  de 8 Hz (Zeng *et al.*, 1990). Os dubletos a  $\delta$  3,65 e 3,36, com uma constante de acoplamento  $J$  de 12 Hz, indicam a existência de um sistema AB que pode ser localizado na posição C-23 devido ao sinal observado no espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR a  $\delta$  72,2. O espectro de HMQC permitiu verificar que os prótons H-23a e H-23b estão correlacionados com o carbono assinalado a  $\delta$  72,2, valor referido por diversos autores para os compostos com um grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$  em C-23 (Peraza-Sanchez *et al.*, 1995; Furuya *et al.*, 1987; Sousa *et al.*, 1984; Sashida *et al.*, 1992). A substituição na posição C-24 origina valores inferiores (Kojima *et al.*, 1987; Singh *et al.*, 1990; Sashida *et al.*, 1992). Os dados espectroscópicos deste composto são assim consistentes com a estrutura do ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroxiolean-12-en-28-óico.

### 2.2.2 Determinação do conteúdo em fenóis

O estudo dos compostos fenólicos dos diversos extractos de *S. sclareoides* foi feito por duas metodologias diferentes: quantificação do conteúdo total de fenóis e determinação da percentagem relativa de fenóis por HPLC-DAD. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Os resultados relativos ao conteúdo total de fenóis, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, revelaram que o extracto em butanol é o que possui maior concentração de compostos fenólicos (379,4 mg GAE/g extracto seco), logo seguido dos extractos em etanol e metanol com 140 e 120 mg GAE/g de extracto seco, respectivamente. O extracto aquoso é o que apresenta menor quantidade de compostos fenólicos, apenas 22,4 mg GAE/g de extracto seco.

**Tabela 6.** Compostos fenólicos do extracto de *S. sclareoides* (% relativa de fenóis a 280 nm e conteúdo total de fenóis).

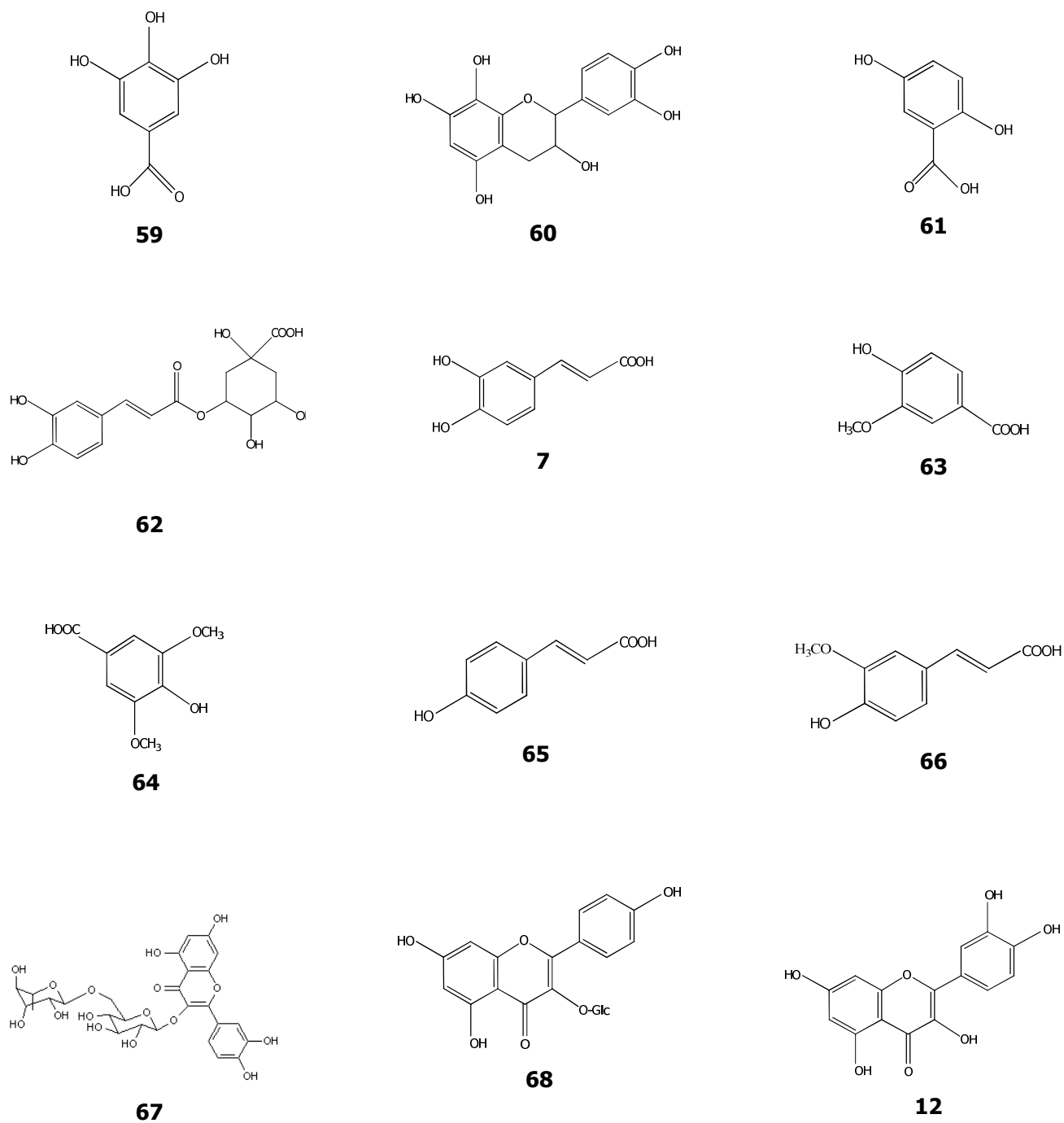
Padrões	Rt (min)	Extractos				
		MeOH	EtOH	BuOH	Me <sub>2</sub> CO	Água
Ácido gálico (59)	1,189	0,8	0,8	1,2	1,7	-
(+)-Catequina (60)	3,421	-	-	0,5	-	-
Ácido gentísico (61)	4,085	-	1,0	-	3,6	-
Ácido clorogénico (62)	4,346	1,1	-	1,3	-	-
Ácido cafeico (7)	5,085	-	0,8	1,4	2,4	-
Ácido vanílico (63)	5,551	2,5	1,3	2,8	6,9	-
Ácido sirínico (64)	6,680	-	-	-	2,1	-
Ácido cumárico (65)	9,692	1,3	0,1	0,6	0,8	-
Ácido ferúlico (66)	12,876	0,8	-	0,5	0,1	-
Rutina (67)	25,104	-	-	-	1,6	-
Glucósido de canferol (68)	32,302	-	-	0,7	-	-
Quercetina (12)	36,658	-	-	1,4	-	-
CTF <sup>a</sup> (mg GAE/g de extracto seco)	-	120,4±2,7	140,8±4,7	379,4±2,7	67,0±2,7	22,4±0,7

<sup>a</sup> CTF – conteúdo total de fenóis.

A análise da composição dos extractos por HPLC-DAD permitiu concluir que o extracto em acetona é o que apresenta maior percentagem de compostos fenólicos (19,2%); é também o que possui maiores concentrações de ácido gentísico (**61**), de ácido cafeico (**7**), de ácido vanílico (**63**) e de ácido sirínico (**64**), o qual não existe em nenhum dos outros extractos. O extracto em butanol é o que contém maior variedade de fenóis, dos quais se salientam a catequina (**60**), o glucósido de canferol (**68**) e a quercetina (**12**), que não

foram detectados em nenhum dos outros extractos. Os extractos em etanol e metanol são constituídos exclusivamente por ácidos fenólicos, apresentando, no entanto, um conteúdo total muito inferior ao dos extractos em butanol e acetona, 4,0% e 6,5%, respectivamente. Verifica-se ainda que o ácido gálico (**59**), o ácido vanílico (**63**) e o ácido cumárico (**65**) estão presentes em todos os extractos.

Não são apresentados resultados relativos ao extracto aquoso porque os seus constituintes se encontram acima do limite de detecção (280 nm). A estrutura dos compostos fenólicos identificados nesta planta encontra-se esquematizada na figura 29.



**Figura 29.** Compostos fenólicos identificados em *S. sclareoides*.

### **2.2.3 Actividade biológica**

#### **2.2.3.1 Actividade fitotóxica**

O extracto em acetona, o único que foi testado, não possui propriedades fitotóxicas. O valor mais elevado (43%) foi obtido para a cultura de *L. paucicostata* e é considerado muito fraco. Os restantes valores situam-se em intervalos inferiores.

#### **2.2.3.2 Actividade antifúngica**

O extracto em acetona tem uma actividade antifúngica considerada fraca (30-50%) nas espécies *P. orizae* e *F. culmorum*. No que respeita às espécies *B. cinerea* e *E. graminis*, a inibição do crescimento situa-se no intervalo de 85-95%, valor considerado pouco significativo por ser inferior ao dos padrões comerciais.

#### **2.2.3.3 Actividade insecticida**

Todos os insectos adultos e larvas sobreviveram após terem sido submetidos à acção do extracto em acetona, pelo que se conclui que este não contém componentes capazes de actuar como insecticidas.

#### **2.2.3.4 Actividade anticolinesterásica**

A acção anticolinesterásica foi determinada pelo método de Ellman (1961) que se baseia na hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase. O produto desta reacção, a colina, reage com DTNB, originando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico de cor amarela que é detectado por absorvância máxima a 412 nm. Considerando a diversidade de resultados obtidos no que respeita à inibição enzimática foram realizados testes estatísticos (tabela 7).

**Tabela 7.** Actividade anticolinesterásica dos extractos de *S. sclareoides* (expressa em % de inibição).

Extracto	Inibição da AChE				Inibição da BChE			
	1000 <sup>a</sup>	500 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	1000 <sup>a</sup>	500 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
<b>Me<sub>2</sub>CO</b>	100 <sup>**</sup>	61 <sup>**</sup>	-	44 <sup>**</sup>	100	72	10	9
<b>EtOH</b>	77 <sup>**</sup>	56 <sup>**</sup>	-	39 <sup>**</sup>	79	15	11	0
<b>BuOH</b>	100 <sup>**</sup>	96 <sup>**</sup>	-	61 <sup>**</sup>	94	86	0	09
<b>Água</b>	67 <sup>**</sup>	62 <sup>**</sup>	-	65 <sup>**</sup>	22	-	22	0
<b>Rivastigmina<sup>b</sup></b>	-	-	95	0	-	-	100	100

<sup>a</sup>Concentração do extracto (µg/mL); <sup>b</sup>Rivastigmina - controlo positivo.

<sup>\*\*</sup>p<0.001; <sup>\*</sup>p<0.01.

Todos os extractos com uma concentração de 10 µg/mL inibem significativamente a enzima AChE, nomeadamente, os extractos em butanol e em água que apresentam uma acção inibitória superior a 60%. Estes valores representam uma actividade superior à da rivastigmina que, a esta concentração, não tem qualquer efeito no enzima em estudo. Os extractos evidenciam uma actividade superior a 50%, para uma concentração de 500 µg/mL, destacando-se o extracto em butanol que inibe a acção enzimática em 96%. A inibição total da actividade enzimática é obtida com os extractos em acetona e em butanol, à concentração de 1000 µg/mL. Os extractos em água e em etanol, a esta concentração, também se revelam bastante eficientes. Os valores obtidos com os extractos de *S. sclareoides* são superiores aos descritos para outros extractos de *Salvia* como, por exemplo, o extracto etanólico de *S. triloba* que, a estas concentrações, tem apenas uma acção moderada (Orhan *et al.*, 2009) e o extracto etanólico de *S. officinalis* que, com uma concentração de 500 µg/mL, apresenta uma acção inibitória muito fraca (16%) (Ferreira *et al.*, 2006); Orhan e colaboradores investigaram a actividade anticolinesterásica de espécies turcas de *Salvia* e apenas 13 dos 56 extractos, com a concentração de

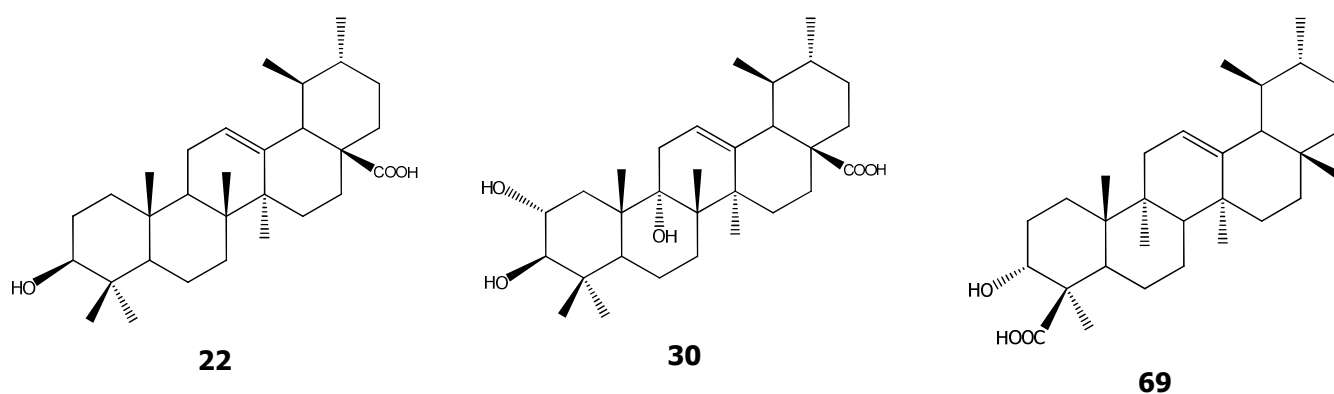


1000 µg/mL, foram capazes de inibir significativamente ( $\geq 50\%$ ) a AChE não tendo sido registada a inibição completa da acção enzimática em nenhum dos ensaios (Orhan *et al.*, 2007). Já o extracto em diclorometano de *S. fruticosa* parece mais eficiente pois, com uma concentração de 100 µg/mL, tem uma acção de inibição enzimática de 51% (Senol *et al.*, 2010).

A actividade dos extractos como inibidores da BChE é bastante fraca ( $< 25\%$ ) às concentrações de 10 e de 100 µg/mL. A acção do enzima é inibida com notável eficiência pelo extracto em butanol com as concentrações de 500 e de 1000 µg/mL (86 e 94%, respectivamente). O extracto em acetona é o único que apresenta uma actividade inibitória de 100%, para a concentração máxima, sendo menos eficiente do que o extracto em butanol à concentração de 500 µg/mL. O extracto etanólico revela-se muito activo (79%) apenas à concentração mais elevada e os resultados obtidos com os extractos aquosos são considerados fracos ( $< 25\%$ ). Os valores registados relativamente aos extractos em acetona, em etanol e em butanol de *S. sclareoides* ultrapassam os valores determinados para extractos de outras espécies como *S. albimaculata*, *S. candidíssima* subsp. *occidentalis*, *S. ceratophylla*, *S. cyanescis*, *S. cryptantha*, *S. frigida*, *S. microstegia* e *S. syriaca* que, à concentração de 1000 µg/mL, evidenciam uma actividade bastante elevada, entre 78 a 92% (Orhan *et al.*, 2007). Nenhum dos extractos destas plantas inibe totalmente a BChE.

Não foram identificados os constituintes dos extractos responsáveis pela acção anticolinesterásica, na medida em que não foram efectuados testes com os compostos isolados. No entanto, a consulta da bibliografia revela que os ácidos triterpénicos são bons inibidores das colinesterases, nomeadamente o ácido ursólico (**22**). Este composto é salientado por Houghton (2006) como o inibidor mais eficaz da AChE num estudo realizado com 139 plantas indianas. Posteriormente, Kolak e colaboradores (2009) testaram o efeito inibidor do ácido ursólico (**22**) na BChE, tendo registado valores superiores aos da galantamina, actualmente comercializada como medicamento para tratar a

doença de Alzheimer. O ácido santolinóico (**30**) isolado de *S. santolinifolia* também é referido como anticolinesterásico embora seja menos eficiente do que a galantamina (Ahmad *et al.*, 2007). Ota e Houghton estudaram a actividade inibitória da AChE dos derivados do ácido  $\beta$ -bosvélico (**69**) ( *$\beta$ -boswellic acid*) isolados de extractos vegetais com propriedades anticolinesterásicas. Os resultados obtidos levaram os autores a sugerir que a actividade inibidora está associada à presença simultânea de um grupo hidroxilo ou de um grupo cetona na posição C-11 e de um grupo hidroxilo na posição C-3 em compostos com uma estrutura do tipo ursano (Ota e Houghton, 2008). A figura 30 permite comparar a estrutura dos compostos **22**, **30** e **69**.



**Figura 30.** Ácidos triterpénicos com acção anticolinesterásica.

Com base na informação disponível, e tendo em vista que o extracto em acetona de *S. sclareoides* é um dos mais activos, é razoável supor que a sua acção esteja relacionada com a presença do ácido ursólico, um dos seus constituintes maioritários. Esta hipótese necessita, contudo, de ser investigada futuramente já que outros compostos terpénicos também conferem propriedades anticolinesterásicas, designadamente, os monoterpenos que se encontram nos óleos essenciais, conforme tem sido divulgado por diversos

autores (Miiyzawa e Yamafugi, 2005; Houghton *et al.*, 2006; El-Hela e Abdullah, 2006; Orhan *et al.*, 2008).

### 2.2.3.5 Actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos extractos de *S. sclareoides* foi avaliada por dois métodos: DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O primeiro baseia-se na reacção do radical DPPH com um composto antioxidante, que leva à alteração da cor da solução de violeta para amarelo à medida que o DPPH é reduzido. Por meio do segundo teste é possível verificar se os extractos inibem a oxidação do  $\beta$ -caroteno na presença do ácido linoleico em condições favoráveis à ocorrência de oxidação.

A quantificação da actividade antioxidante dos extractos de *S. sclareoides* é expressa em percentagem de inibição da oxidação e em valores de IC<sub>50</sub> (concentração à qual se verifica 50% de acção antioxidante).

A análise dos resultados obtidos pelo método do DPPH (tabela 8) permite verificar que o extracto em butanol é o que apresenta a maior actividade antioxidante, atingindo valores semelhantes aos do padrão BHT para as concentrações de 50, 100 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Em concentrações inferiores (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) a sua actividade ultrapassa a do BHT, situando-se nos valores de 32,9% e 53,9%. Os extractos em metanol e em etanol são mais eficazes do que os extractos em acetona e aquoso. No entanto, a sua acção evidencia-se como moderada (< 50%) ocorrendo apenas às concentrações mais elevadas (100 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) e sendo muito fraca em todos os outros ensaios. A percentagem de inibição de oxidação obtida por todos os extractos é inferior à do ácido ascórbico.

**Tabela 8.** Actividade antioxidante (% de inibição e IC<sub>50</sub>).

Extracto	Método	Concentração dos extractos (µg/mL)							IC <sub>50</sub> (µg/mL)
		1	3	5	10	50	100	500	
<b>Me<sub>2</sub>CO</b>	DPPH	<5	<5	<5	<5	6,1± 0,8	13,9± 1,2	30,5±2,1	>500
	β-caroteno	6,9±2,8	19,2±4,4	39,6±11,9	35,2±3,4	51,6±1,7	54,4±2,3	80,8±4,5	38,4
<b>BuOH</b>	DPPH	<5	6,1±2,0	32,9±2,4	53,9±0,7	56,9±4,0	58,7±3,5	59,5±2,9	7,9
	β-caroteno	<5	25,2±1,7	29,4±3,9	32,4±4,0	40,0±3,4	54,0±0,6	76,4±1,7	57,6
<b>MeOH</b>	DPPH	<5	<5	<5	<5	5,3±1,3	42,9±3,9	47,7±1,8	113,9
	β-caroteno	<5	5,7±11,1	19,3±2,3	17,3±0,6	53,9±2,4	58,4±5,7	76,1±2,2	60,6
<b>EtOH</b>	DPPH	<5	<5	<5	<5	6,6 ± 4,8	37,2±4,8	40,9±2,5	133,7
	β-caroteno	<5	<5	16,5±2,8	26,0±2,8	37,6±7,9	47,6±0,6	81,2±9,6	78,6
<b>Água</b>	DPPH	<5	<5	<5	<5	<5	13,7±4,5	19,6±4,1	>500
	β-caroteno	<5	<5	9,7±7,2	34,3±0,7	52,4±6,1	51,2±4,2	65,1±0,5	85,1
<b>AA<sup>a</sup></b>	DPPH	<5	31,0±2,9	48,5±0,8	70,9±1,5	72,8±1,1	71,1±2,1	73,1±0,6	4,9
	β-caroteno	23,1±6,8	26,1±8,2	32,1±3,3	39,8±2,3	61,6±1,2	68,3±6,8	71,8±5,2	26,1
<b>BHT<sup>a</sup></b>	DPPH	<5	7,4±1,8	9,6±2,7	34,1±2,7	59,8±1,1	59,7±0,7	61,3±0,7	29,7
	β-caroteno	44,6±10,9	68,8±0,0	81,2±1,7	72,2±0,9	86,0±1,7	84,0±1,1	92,7±2,1	0,271

<sup>a</sup> AA e BHT - controlo positivo.

Os testes realizados pelo método do β-caroteno/ácido linoleico mostraram que todos os extractos com concentrações inferiores a 50 µg/mL são pouco activos (< 50%), comparados com o BHT. Os extractos em acetona, em metanol e em água têm uma acção antioxidante superior a 50% às concentrações de 50, 100 e 500 µg/mL, destacando-se, no último caso, o extracto em acetona cuja actividade (80,8 %) se aproxima mais dos valores obtidos com o BHT (92,7%). A actividade obtida com o extracto etanólico pode ser considerada moderada pois situa-se abaixo dos 50% para quase todas as concentrações, atingindo um valor significativo (81,2%) apenas no ensaio de concentração mais elevada (500 µg/mL). A inibição de oxidação obtida com o extracto butanólico é inferior à do teste com o DPPH pois só supera os 50% para concentrações mais elevadas (100 e 500 µg/mL) e é sempre inferior à do padrão. A comparação da

actividade dos extractos com a actividade do ácido ascórbico revela que o extracto em butanol tem uma actividade equivalente à do padrão para as concentrações mais baixas (3, 5 e 10 µg/mL), sendo mesmo ligeiramente superior com a concentração de 500 µg/mL. Os extractos em acetona, em metanol e em etanol também são melhores antioxidantes do que o ácido ascórbico, na concentração mais elevada.

A comparação dos valores de  $IC_{50}$  dos diversos extractos mostra que o extracto butanólico é o mais eficiente como captador do radical DPPH, apresentando um valor de  $IC_{50} = 7,9$  µg/mL semelhante ao do ácido ascórbico e inferior ao do BHT. Os extractos em metanol e em etanol apresentam valores de  $IC_{50}$  superiores a 100 µg/mL, o que traduz uma actividade considerada fraca de acordo com os critérios referidos na literatura (Kamatou *et al.*, 2007). O extracto aquoso e o extracto em acetona são praticamente inactivos com um  $IC_{50} > 500$  µg/mL.

O extracto em acetona destaca-se como o mais activo no que respeita à inibição da oxidação do β-caroteno ( $IC_{50} = 38,4$  µg/mL), sendo o único comparável ao ácido ascórbico. O extracto em butanol evidencia uma actividade significativa ( $IC_{50} = 57,6$  µg/mL) quando testado pelo método do β-caroteno/ácido linoleico e os extractos em metanol e em etanol também são eficientes pois os seus valores de  $IC_{50}$  são inferiores em 50% relativamente aos determinados pelo método de DPPH. O extracto aquoso também é o menos activo como antioxidante quando avaliado por este método.

De uma forma geral, verifica-se que a actividade antioxidante dos extractos é variável, dependendo do método utilizado e dos padrões escolhidos. No entanto, em vista dos resultados globais, pode concluir-se que o extracto em butanol é o que possui maior potencial antioxidante. Os extractos em metanol e em etanol têm uma actividade mais fraca, seguindo-se o extracto em acetona. O extracto aquoso é claramente o menos activo. Deve ainda salientar-se que o grau de actividade antioxidante pode ser relacionado com o conteúdo total de

fenóis que é mais elevado nos extractos mais eficientes. Esta relação está em concordância com os estudos publicados por diversos autores que têm conseguido estabelecer uma relação linear entre o conteúdo total de fenóis e a actividade antioxidante (Unal *et al.*, 2008; Tosun *et al.*, 2009; Kamatou *et al.*, 2010).

A análise dos extractos por HPLC-DAD permitiu identificar ácidos fenólicos com propriedades comprovadamente antioxidantes como o ácido ferúlico e o ácido cafeico (Zheng e Wang, 2001; Janicsak *et al.*, 2010). Flavonóides hidroxilados como a quercetina e o canferol e os respectivos glucósidos costumam evidenciar uma acção antioxidante mais elevada do que os ácidos fenólicos (Zheng e Wang, 2001) e são também componentes dos extractos estudados. A quercetina, a rutina e a catequina, quando testados pelo método de DPPH, mostram-se mais eficientes do que o BHT, ultrapassando o valor de 90% de inibição do processo oxidativo (Ruzic *et al.*, 2010). Relativamente à quercetina, salienta-se que o seu potencial antioxidante é suficientemente interessante para que esteja a ser investigada a possibilidade de inserir moléculas deste composto em nanocápsulas, com o propósito de facilitar a sua introdução nas células que se pretende submeter à sua acção (Kumari *et al.*, 2010; Collabase-Urrutia *et al.*, 2010).

#### **2.2.3.6 Testes de toxicidade**

O estudo da toxicidade dos extractos em acetona, em butanol, em metanol, em etanol e em água baseou-se na determinação da viabilidade celular pelo método de MTT e na avaliação da genotoxicidade, recorrendo-se para esta última à determinação do índice mitótico e das aberrações cromossómicas. Os resultados podem ser observados na tabela 9.

**Tabela 9.** Toxicidade dos extractos de *S. sclareoides*.

Extractos	Toxicidade	Genotoxicidade	
	Viabilidade celular <sup>a</sup>	Índice <sup>b</sup> mitótico	Aberrações cromossómicas
<b>Me<sub>2</sub>CO</b>	-	10,50±4,1	1,25±1,3
<b>BuOH</b>	151,5±52,6	10,25±2,2	1,00±1,2
<b>MeOH</b>	140,6±68,2	-	-
<b>EtOH</b>	105,2±46,9	9,25±3,8	0,75±1,0
<b>Água</b>	79,3±28,0	14,00±3,7	1,00±0,8
<b>Controlo negativo</b>	100±37,5	12,75±3,3	1,00±0,8
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%)</b>	34±17,6	1,75±1,0	5,00±2,2

<sup>a</sup> – % relativamente ao controlo negativo; <sup>b</sup> – número de células em mitose por cada 1000 células contadas.

Os extractos testados não revelaram qualquer toxicidade à concentração de 4 mg/mL. A viabilidade celular não foi afectada nem se registaram sinais de genotoxicidade. Estes resultados estão em concordância com os dados publicados por diversos autores. Loizzo *et al.* refere a ausência de toxicidade do óleo essencial de *S. leriifolia* em células 142BR, à concentração de 1 mg/mL (Loizzo *et al.*, 2009) e Ramirez *et al.* não registou qualquer efeito tóxico do extracto aquoso de *Salvia scutellarioides* administrado oralmente a ratinhos numa dose de 2 g/kg (Ramirez *et al.*, 2007).

## **2.3 Avaliação da bioactividade e estudo fitoquímico de *A. vogelii*. Pesquisa dos princípios activos.**

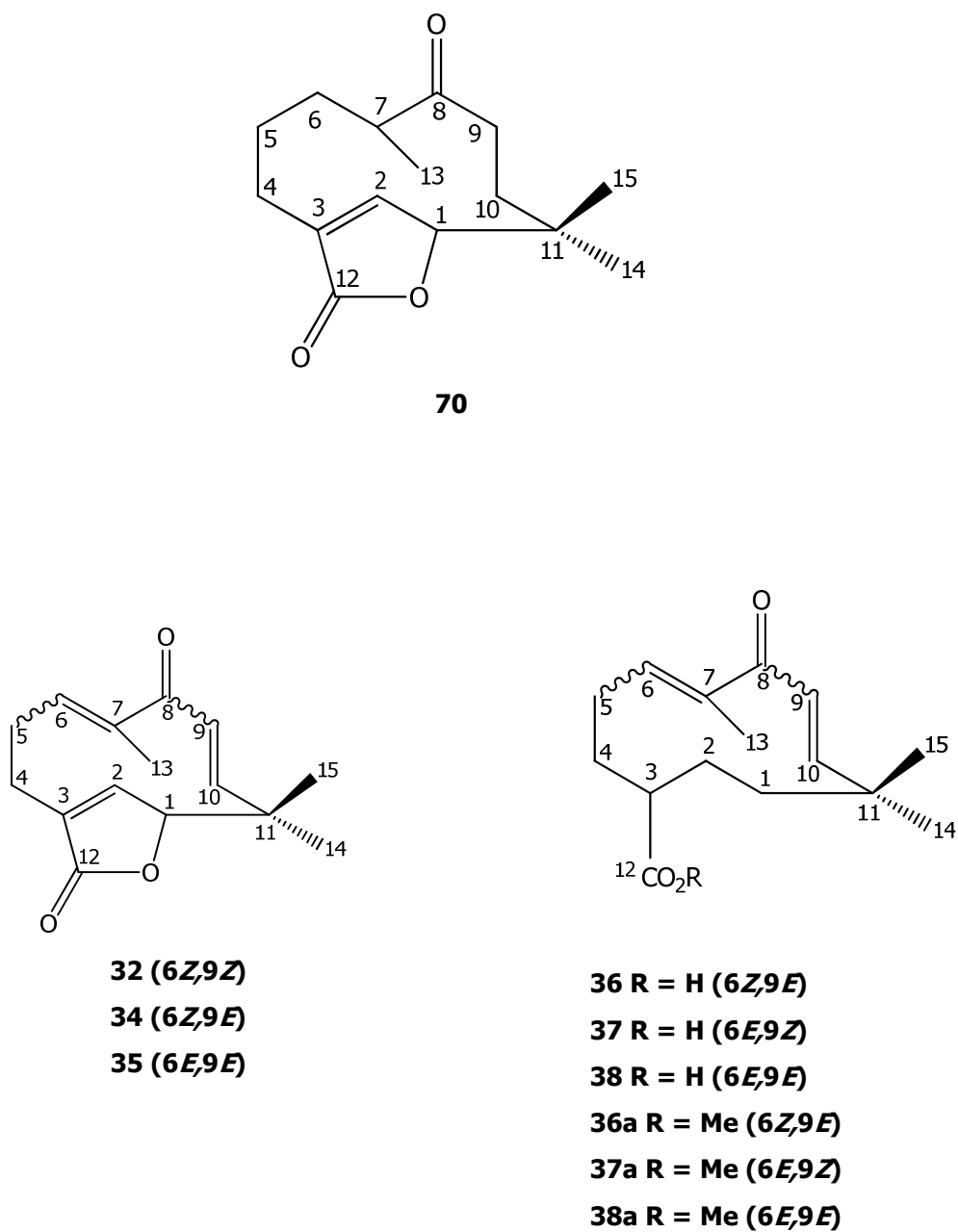
### **2.3.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados do extracto em clorofórmio**

O fraccionamento do extracto por CLC originou cerca de 30 fracções, tendo sido seleccionadas as que foram obtidas em quantidade suficiente para serem submetidas aos testes de actividade biológica, uma vez que a obtenção de resultados interessantes após a conclusão destes ensaios, implicaria a separação das misturas com a finalidade de isolar e identificar os compostos responsáveis pela actividade detectada.

A separação cromatográfica subsequente incidiu nas fracções que evidenciaram a melhor acção fitotóxica e conduziu ao isolamento de um novo derivado do humuleno, o (2*Z*)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida (**70**), das asteriscunolidas A (**32**), C (**34**) e D (**35**), e dos ácidos (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**36**), (2*Z*,6*E*,9*Z*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**37**) e (2*Z*,6*E*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-óico (**38**). Estes ácidos foram caracterizados na forma dos respectivos ésteres metílicos (**36a**, **37a** e **38a**).

A estrutura dos compostos, **70**, **32**, **34**, **35**, **36a**, **37a** e **38a** está representada na figura 31.

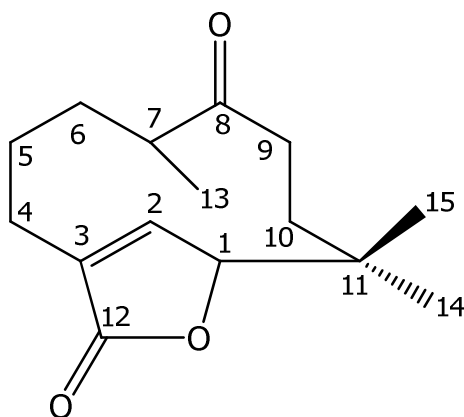




**Figura 31.** Estrutura dos compostos isolados das fracções biologicamente activas de *A. vogelii*.

### 2.3.1.1 (2Z)-8-Oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida (70)

Este composto (figura 32) apresenta-se como uma substância cristalina com intervalo de fusão entre 112 e 115 °C.



**Figura 32.** Estrutura do composto **70**.

No espectro de IV observam-se as bandas características de uma  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), de um grupo carbonilo ( $1702\text{ cm}^{-1}$ , cetona), de dois grupos metilo geminais ( $1370, 1326\text{ cm}^{-1}$ ) e de uma ligação dupla (cerca de  $1600\text{ cm}^{-1}$ ).

O seu espectro de massa apresenta um pico molecular  $M^+$  a  $m/z$  250 correspondente à fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_3$ .

No espectro de  $^1\text{H-NMR}$  observam-se dois singletos a  $\delta$  7,08 e 4,55, correspondentes a um próton cada um. Por analogia com os dados espectroscópicos das asteriscunolidas, podemos atribuir estes sinais ao próton vinílico H-2 e ao próton H-1. A  $\delta$  1,21 e 1,11 surgem dois singletos, integrando, cada um, três prótons, o que permite atribuí-los aos dois grupos metilo geminais. Um terceiro grupo metilo origina um dubleto a  $\delta$  1,03, sugerindo assim a hidrogenação da ligação dupla entre C-6 e C-7, uma vez que o desvio

químico observado é demasiadamente baixo para que possa ser atribuído a um metilo vinílico. A ausência dos dubletos típicos do sistema AB correspondentes aos prótons H-9 e H-10 permite concluir que a ligação entre os átomos C-9 e C-10 também se encontra hidrogenada.

Considerando os dados espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -NMR, IV e de espectrometria de massa, é possível propor para o composto **70** a estrutura de uma lactona sesquiterpénica com o anel monocíclico do humuleno, diferindo, no entanto, das asteriscunolidas pela hidrogenação das ligações duplas já referidas.

As informações obtidas por análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR são concordantes com a estrutura sugerida. Este espectro apresenta quinze sinais, dois dos quais indicam a existência de grupos carbonilo; um a  $\delta$  213,5 é assignável à cetona localizada em C-8, e outro a  $\delta$  173,5 é atribuído ao carbonilo do anel de lactona (C-12).

Um sinal  $\delta$  147,5 é atribuído ao C-2 do anel de lactona e outro sinal a  $\delta$  134,3 é originado pelo carbono quaternário C-3 que faz parte da ligação dupla entre C-2 e C-3. Não são observados outros sinais cujos desvios químicos possam ser atribuídos a átomos de carbono envolvidos em ligações duplas. Por outro lado, aparecem cinco sinais relativos a grupos  $\text{CH}_2$  que confirmam a estrutura proposta anteriormente. De facto, a hidrogenação das ligações duplas entre C-6 e C-7 e entre C-9 e C-10 resulta no aparecimento de três novos grupos  $\text{CH}_2$ , cuja existência se comprova por análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR.

Observam-se ainda sinais relativos ao átomo de carbono quaternário C-11 a  $\delta$  38,2 e aos grupos metilo C-13, C-14 e C-15 a  $\delta$  18,5, 23,8 e 29,3, respectivamente. O átomo de carbono C-1, que integra o anel lactona, origina um sinal com o desvio químico característico de  $\delta$  87,8. A  $\delta$  44,5 surge o sinal relativo ao átomo de carbono C-7.

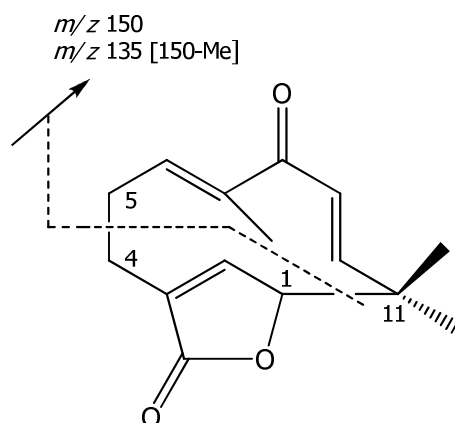
A correlação heteronuclear  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  mostra-nos que o próton H-7 está incluído no multipeto do espectro de  $^1\text{H}$ -NMR situado entre  $\delta$  2,45 e  $\delta$  2,31, que integra mais quatro prótons, incluindo H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ , tal como foi observado no espectro COSY.

### 2.3.1.2 Asteriscunolida A (32)

Este composto foi isolado na forma de cristais incolores com ponto de fusão 155  $^{\circ}\text{C}$ .

No espectro de IV distinguem-se as bandas correspondentes a uma  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada ( $3000, 1750\text{ cm}^{-1}$ ) uma cetona conjugada ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) e dois grupos metilo geminais ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ).

O espectro de massa apresenta os sinais correspondentes ao ião molecular  $\text{M}^+$  a  $m/z$  246 e a dois fragmentos principais a  $m/z$  150 e  $m/z$  135. Estes fragmentos são típicos das asteriscunolidas e resultam da cisão das ligações 1(11) e 4(5) tal como esquematizado na figura 33).



**Figura 33.** Padrão de fragmentação das asteriscunolidas.

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto **32** apresenta dois singletos a  $\delta$  1,40 e 1,19, originados por dois grupos metilo ligados a um átomo de carbono quaternário (Me-14 e Me-15) e um terceiro singlete a  $\delta$  1,94 assignável a um grupo metilo vinílico (Me-13). A  $\delta$  6,15 e 5,29 estão centrados dois dubletos correspondentes ao sistema AB de dois prótons vinílicos (H-9 e H-10), com uma constante  $J_{9,10} = 13,8$  Hz. O multiplete centrado a  $\delta$  6,00 corresponde ao próton vinílico (H-6) conjugado com a cetona e acoplado com o próton H-5 $\beta$ , com uma constante  $J_{6,5\beta} = 6,8$  Hz; esta constante foi determinada após a irradiação do referido multiplete, que levou à transformação do multiplete a  $\delta$  2,8-2,2 em dublete, demonstrando assim o acoplamento entre os dois prótons. O singlete correspondente ao próton vinílico H-2, conjugado com o carbonilo da lactona, aparece a  $\delta$  7,00. Entre  $\delta$  2,2 e  $\delta$  2,8 observa-se um multiplete originado pelos quatro prótons H-4 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$ . A  $\delta$  4,69 encontra-se o singlete assignável a um próton geminal com uma função oxigenada (H-1). Estes dados, conjuntamente com as características dos espectros de IV e massa, permitem identificar o composto **32** como a asteriscunolida A, na medida em os dados discutidos são concordantes com os descritos por San Feliciano e colaboradores (San Feliciano *et al.*, 1982; San Feliciano *et al.*, 1984; San Feliciano *et al.*, 1985a).

### 2.3.1.3 Asteriscunolida C (34)

A asteriscunolida C apresenta-se na forma de cristais incolores e o seu ponto de fusão é 165  $^{\circ}\text{C}$ .

O espectro de IV apresenta as bandas características de uma  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada (2900, 1760  $\text{cm}^{-1}$ ), de uma cetona conjugada (1650  $\text{cm}^{-1}$ ), e de dois grupos metilo geminais (1370  $\text{cm}^{-1}$ ).

No espectro de massa observam-se o sinal correspondente ao ião molecular  $\text{M}^+$  a  $m/z$  246 e os sinais típicos das asteriscunolidas ( $m/z$  150 e 135) que indicam

a existência de fragmentos originados pela quebra das ligações entre C-1 e C-11 e entre C-4 e C-5.

No espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto **34** podem ser observados três singletos a  $\delta$  1,86, 1,36 e 1,27, correspondentes a um grupo metilo vinílico e a dois grupos metilo geminais (Me-13, Me-14 e Me-15, respectivamente). Um sistema AB de dois prótons vinílicos origina dois dubletos centrados a  $\delta$  6,27 e 5,91 (H-10 e H-9), sendo a constante de acoplamento  $J_{9,10} = 16,5$  Hz. Um dubleto largo centrado a  $\delta$  5,49 indica a presença de um próton vinílico (H-6) e o singlete a  $\delta$  6,96 é originado pelo próton vinílico H-2 conjugado com o carbonilo da lactona. Um multiplete situado entre  $\delta$  2,5 e 2,3 é atribuído a quatro prótons ligados a dois átomos de carbono secundários (H-4 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$ ) e o singlete a  $\delta$  4,71 representa o sinal do próton H-1. Todas as características espectroscópicas do composto **34** correspondem às que se encontram descritas na literatura para a asteriscunolida C (San Feliciano *et al.*, 1984; San Feliciano *et al.*, 1985a).

#### 2.3.1.4 Asteriscunolida D (35)

A asteriscunolida D é uma substância cristalina, incolor e tem ponto de fusão 148  $^{\circ}\text{C}$ .

No espectro de IV é possível observar as bandas características das asteriscunolidas: 3100, 1760  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à  $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada, 1660  $\text{cm}^{-1}$  da cetona conjugada e 1350  $\text{cm}^{-1}$  dos dois grupos metilo geminais.

Os fragmentos originados pela quebra das ligações entre C-1 e C-11 e entre C-4 e C-5 originam sinais observáveis a  $m/z$  150 e 135 e o pico molecular  $\text{M}^+$  aparece a  $m/z$  246.

O espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto **35** apresenta sinais correspondentes a três grupos metilo a  $\delta$  1,76, 1,23 e 1,28 (Me-13, Me-14 e Me-15, respectivamente).

Os dois dubletos a  $\delta$  6,09 e 5,72 permitem identificar o sistema AB de dois prótons vinílicos (H-9 e H-10), cuja constante de acoplamento é  $J_{9,10} = 16,8$  Hz. Um dubleto a 5,51 ppm é assignável a um próton vinílico (H-6) e um singlete a 7,03 ppm é originado pelo próton vinílico H-2 conjugado com o carbonilo da lactona. O multiplete localizado entre 2,4 e 2,7 ppm corresponde aos prótons H-4 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , H-5 $\alpha$  e H-5 $\beta$  e um singlete a  $\delta$  4,76 é assignado ao próton geminal com uma função oxigenada (H-1). Os dados espectroscópicos deste composto permitiram identificá-lo como a asteriscunolida D, pois coincidem totalmente com os dados descritos na literatura para esta lactona sesquiterpénica (San Feliciano *et al.*, 1984; San Feliciano *et al.*, 1985a).

As configurações nas ligações duplas, característica estrutural que distingue as diversas asteriscunolidas, foram assignadas a partir do valor das constantes de acoplamento e estão registadas na tabela 10.

**Tabela 10.** Configurações nas ligações duplas das asteriscunolidas.

Composto	$J_{5\beta,6}$ (Hz)	Configuração	$J_{9,10}$ (Hz)	Configuração
<b>32</b>	6,8	<b>6Z</b>	13,8	<b>9Z</b>
<b>34</b>	12,9	<b>6Z</b>	16,5	<b>9E</b>
<b>35</b>	8,9	<b>6E</b>	16,8	<b>9E</b>

#### 2.3.1.5 (2Z,6Z,9E)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (36a)

Este composto é um óleo incolor cujo espectro de IV apresenta as bandas de absorção típicas de uma cetona ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) e de um carbonilo pertencente a um grupo éster ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ).

O espectro de massa revela um pico molecular  $M^+$  a  $m/z$  262 concordante com a fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_3$ . Os fragmentos de maior intensidade aparecem a  $m/z$  150, 135, 107 e 96, sendo os dois primeiros resultantes da cisão das ligações entre C-1 e C-11 e entre C-4 e C-5, tal como acontece nas

asteriscunolidas. A perda dos grupos MeOH e Me-CO<sub>2</sub> origina fragmentos característicos a  $m/z$  230 e 203, respectivamente.

Nos espectros de <sup>1</sup>H-NMR dos compostos **36a**, **37a** e **38a** observam-se alguns sinais comuns aos espectros das asteriscunolidas, nomeadamente os sinais correspondentes aos dois grupos metilo geminais, ao metilo vinílico e aos quatro prótons vinílicos, dos quais, dois fazem parte de um sistema AB. Devido à inexistência do anel de lactona, o próton geminal à função oxigenada desaparece e dá lugar a dois prótons ligados a um átomo de carbono secundário. É ainda observável o singlete correspondente ao metilo do grupo éster.

O espectro de <sup>1</sup>H-NMR do composto **36a** apresenta três singletos a  $\delta$  3,76, 1,85 e 1,21 correspondentes, respectivamente, ao metilo do grupo éster, ao grupo metilo vinílico e aos dois grupos metilo geminais, pois o sinal a  $\delta$  1,21 integra seis prótons. A  $\delta$  6,67 e 5,88 estão centrados os dubletos originados pelos prótons H-10 e H-9 com uma constante de acoplamento  $J_{9,10} = 16,4$  Hz. O sinal do próton vinílico H-6 surge a  $\delta$  5,41 na forma de multipeto e o tripleto observável a 5,83 ppm indica a existência de um quarto próton vinílico (H-2), acoplado com os prótons metilénicos H-1 $\alpha$  e H-1 $\beta$ , com uma constante de acoplamento  $J_{1,2} = 9,0$  Hz. O multipeto centrado a 2,62 ppm é originado pelos prótons H-1 $\alpha$  e H-1 $\beta$ .

Com base nos dados espectroscópicos do composto **36a** e nos dados da literatura (El-Dahmy *et al.*, 1985) foi-lhe atribuída a estrutura do (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo.



### 2.3.1.6 (2Z,6E,9Z)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (37a)

Este éster foi isolado na forma de óleo incolor.

No espectro de IV observam-se as bandas características de uma cetona ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) e de um carbonilo pertencente a um grupo éster ( $1710\text{ cm}^{-1}$ ).

O espectro de massa apresenta um pico molecular  $M^+$  a  $m/z$  262 que corresponde à fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_3$ . A  $m/z$  150 e 135 aparecem sinais de maior intensidade atribuídos aos fragmentos originados pela quebra das ligações entre C-1 e C-11 e entre C-4 e C-5, tal como se verifica nas asteriscunolidas. A perda dos grupos MeOH e Me-CO<sub>2</sub> origina os fragmentos a  $m/z$  230 e 203, respectivamente.

No espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto **37a** surgem três singletos a  $\delta$  3,40, 1,85 e 0,92 que revelam a existência de um metilo pertencente a um grupo éster, de um grupo metilo vinílico e de dois grupos metilo geminais, respectivamente. Os dubletos do sistema AB, característico destes compostos, surgem a 5,89 e 5,28 ppm (H-9 e H-10), com uma constante  $J_{9,10} = 13,4\text{ Hz}$ . Os prótons vinílicos H-6 e H-2 originam os tripletos observados a 6,20 e 5,59 ppm, respectivamente; o próton H-6 está acoplado com H-5 com uma constante  $J_{5,6} = 7,0\text{ Hz}$ . O multiplete a  $\delta$  2,49 é assignável ao próton H-1 cujo acoplamento com H-2 tem uma constante  $J_{1,2} = 9,0\text{ Hz}$ .

A comparação dos dados espectroscópicos obtidos para este composto com os dados da literatura (El-Dahmy *et al.*, 1985) permite identificá-lo como o (2Z,6E,9Z)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo.

### 2.3.1.7 (2Z,6E,9E)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (38a)

Este composto apresenta-se na forma de óleo incolor.

No espectro de IV aparecem as bandas típicas de uma cetona ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ) e de um carbonilo pertencente a um grupo éster ( $1710\text{ cm}^{-1}$ ).

No espectro de massa observa-se o pico molecular  $M^+$  a  $m/z$  262 concordante com a fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_3$ . Os fragmentos resultantes da cisão das ligações entre C-1 e C-11 e entre C-4 e C-5, dão origem aos sinais de maior intensidade a  $m/z$  150 e 135, à semelhança do que acontece nas asteriscunolidas. A perda dos grupos MeOH e Me-CO<sub>2</sub> origina fragmentos característicos a  $m/z$  230 e 203, respectivamente.

No espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do composto **38a** aparecem sinais idênticos aos dos ésteres **36a** e **37a**. Três singletos a  $\delta$  3,39, 1,82 e 0,97 indicam a presença do metilo do grupo éster, de um grupo metilo vinílico e de dois grupos metilo geminais, respectivamente. O sistema AB constituído pelos prótons H-9 e H-10 origina os dubletos situados a 6,02 e 6,26 ppm, sendo a constante de acoplamento  $J_{9,10} = 16,6\text{ Hz}$ . O tripleto a  $\delta$  5,59 corresponde ao próton vinílico H-6, acoplado aos prótons H-5 com uma constante  $J_{5\beta,6} = 6,5\text{ Hz}$  e o sinal do próton vinílico H-2 surge com um desvio de 5,52 ppm na forma de tripleto, acoplado a H-1 com uma constante  $J_{1,2} = 8,6\text{ Hz}$ . Por último, a  $\delta$  2,1 ppm observa-se o multiplete originado por H-1.

Este composto foi identificado como o (2Z,6E,9E)-8-oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo uma vez que os seus dados espectroscópicos são concordantes com os descritos para esta estrutura (El-Dahmy *et al.*, 1985).

As configurações na ligação dupla 9(10) foram determinadas com base nas constantes de acoplamento entre os prótons H-9 e H-10; a uma constante de,

aproximadamente, 16 Hz corresponde a configuração *E* (trans), enquanto a configuração *Z* (cis) é assignada para valores de 13 Hz. Por outro lado, a configuração na ligação dupla 6(7) foi assignada a partir dos desvios químicos observados para os átomos de carbono C-5 e C-13 no espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, dado que os desvios de valor mais elevados se encontram relacionados com uma configuração *Z* (cis).

Tal como referido para as asteriscunolidas, também os ésteres seus precursores diferem na configuração nas ligações duplas. Na tabela 11, estão representados os dados relevantes para a assignação das configurações das ligações duplas.

**Tabela 11.** Configurações nas ligações duplas dos ésteres **36a**, **37a** e **38a**.

Composto	$\delta$ C-5 (ppm)	$\delta$ C-13 (ppm)	Configuração	$J_{9,10}$ (Hz)	Configuração
<b>36a</b>	31,2	21,2	<b>6<i>Z</i></b>	16,4	<b>9<i>E</i></b>
<b>37a</b>	25,2	11,0	<b>6<i>E</i></b>	13,4	<b>9<i>Z</i></b>
<b>38a</b>	25,3	1,9	<b>6<i>E</i></b>	16,6	<b>9<i>E</i></b>

### 2.3.2 Actividade biológica

#### 2.3.2.1 Actividade fitotóxica

Relativamente à planta em estudo, é possível afirmar que o extracto de *A. vogelii* não contém potenciais agentes herbicidas pois o crescimento das plantas cultivadas na estufa, previamente pulverizadas com as soluções de extracto e de fracções, não sofreu qualquer alteração, comparativamente ao grupo de controlo. Na sequência destes ensaios, e segundo o critério já referido, procedeu-se à realização de testes com os outros organismos, *A. filiculoides*, *L. paucicostata*, *S. alba* e *S. acutus*, tendo sido possível detectar, nalgumas fracções, a existência de substâncias mais activas (tabela 12).

**Tabela 12.** Actividade fitotóxica do extracto e das fracções de *A. vogelii* (% de inibição do crescimento).

Solução testada <sup>a</sup>	Organismos			
	<i>L. paucicostata</i>	<i>A. filiculoides</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. acutus</i>
Extracto em CHCl <sub>3</sub>	23	0	10	30
Fracção A	30	0	10	26
Fracção B	26	0	6	1
Fracção C	24	0	0	7
Fracção D	11	0	10	25
Fracção E	40	0	14	26
Fracção F	37	90	19	79
Fracção G	28	80	23	65
Fracção H	50	98	6	0
Fracção I	58	100	1	73
Fracção J	83	100	17	91
Fracção L	31	0	11	0
Fracção M	35	0	19	17
Fracção N	20	0	4	0
Fracção O	3	0	11	0

<sup>a</sup> – concentração da solução inicial das soluções: 6mg/mL; concentração final: 0.06 mg/mL.

Os resultados dos testes efectuados para determinação de acção fitotóxica mostram que o extracto em clorofórmio não tem influência no desenvolvimento das espécies vegetais utilizadas uma vez que os valores obtidos revelam uma acção inibitória muito fraca. No que respeita às fracções, verifica-se que as culturas de *L. paucicostata*, *A. filiculoides* e *S. acutus* sofreram inibições de crescimento superiores a 50% quando submetidas à acção das fracções F, G, H, I e J, tendo as duas últimas provocado uma inibição total do crescimento da azola. Todas as outras fracções mostraram-se inócuas para os organismos referidos pois, ou não afectaram o seu crescimento (0% de inibição), ou causaram inibições pouco significativas. De acordo com o critério de avaliação já definido, podemos classificar a acção fitotóxica das fracções de *A. vogelii* como moderada ou média, sendo a fracção J a mais eficiente pois permitiu

ultrapassar os 90% de inibição do crescimento de duas espécies diferentes, *A. filiculoides* e *S. acutus*.

A diferença observada entre a actividade do extracto e a actividade das fracções está provavelmente relacionada com a concentração dos agentes activos. Considerando que as soluções são preparadas a partir de uma quantidade idêntica de extracto ou fracção (6 mg), os compostos activos deverão estar presentes nas fracções em concentrações mais elevadas do que no extracto, valores que deverão estar mais próximos da concentração mínima necessária para que possam actuar. Conclui-se assim que apenas as F, G, H, I e J continham compostos capazes de afectar o crescimento de organismos vegetais, sendo por isso as mais interessantes para o estudo fitoquímico.

#### **2.3.2.2 Actividade antifúngica**

Os valores obtidos após a determinação da actividade antifúngica são considerados fracos pois situam-se na sua maioria abaixo de 50% de inibição do crescimento (tabela 13). As fracções I e J são as mais eficientes no que respeita à inibição do crescimento de *B. cinerea* não conseguindo, no entanto, ultrapassar o valor de 95%. Todas as outras espécies de fungos (*P. orizae*, *F. culmorum* e *E. graminis*) são praticamente indiferentes aos compostos extraídos de *A. vogelii*.

**Tabela 13.** Actividade antifúngica (% de inibição do crescimento) do extracto e fracções de *A. vogelii*.

SOLUÇÃO	Extracto	Fracção A	Fracção I	Fracção J	Fracção L	Fracção N
<b>PLANTA/ FUNGO</b>						
<i>Capsicum annum</i> (paprika)						
<i>Botrytis cinerea</i>	30-50	30-50	85-95	85-95	10-30	10-30
<i>Orizae sativa</i> (arroz)						
<i>Pyricularia orizae</i>	30-50	30-50	30-50	50-85	10-30	5-10
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)						
<i>Erisiphe graminis</i>	50-85	50-85	50-85	50-85	30-50	50-85
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)						
<i>Fusarium culmorum</i>	10-30	10-30	10-30	10-30	10-30	10-30

### 2.3.2.3 Actividade insecticida

O efeito do extracto em clorofórmio foi nulo pelo que se conclui que não possui compostos com potencial aplicação como insecticidas.

### 2.3.2.4 Actividade biológica dos compostos isolados

Os compostos maioritários isolados das fracções activas foram avaliados quanto à sua acção fitotóxica e antitumoral. Os resultados estão registados na tabela seguinte.

**Tabela 14.** Actividade fitotóxica<sup>a</sup> (% de inibição do crescimento) e antitumoral<sup>b</sup> (IC<sub>50</sub>) dos compostos isolados das fracções bioactivas de *A. vogelii*.

Composto	Espécie vegetal		Cultura de células	Células tumorais			
	<i>S. acutus</i>	<i>L. paucicostata</i>		P-388	A-549	HT-29	MEL-28
<b>70</b>	3	50	68	40	>40	> 40	> 40
<b>32</b>	75	90	96	4	4	10	4
<b>34</b>	62	94	100	4	4	10	4
<b>35</b>	49	100	100	1	1	2	1
<b>36a</b>	21	89	7	10	10	20	10
<b>37a</b>	25	41	0	20	20	> 40	20
<b>38a</b>	11	61	0	40	40	> 40	>40
<b>Cisplatina<sup>d</sup></b>	-	-	-	8	8	16	8

<sup>a</sup> – concentração da solução inicial das soluções: 6mg/mL; concentração final: 0.06 mg/mL.

<sup>b</sup> – IC<sub>50</sub> em µM.

<sup>c</sup> – P388 = linfoma de ratinhos; A-549 = carcinoma do pulmão humano; HT-29 = carcinoma do cólon humano; MEL-28 = melanoma humano.

<sup>d</sup> – cisplatina é o controlo positivo.

A análise dos resultados permite concluir que as asteriscunolidas A, C e D são os agentes que conferem as propriedades fitotóxicas às fracções estudadas, dado que a sua actividade ultrapassa os 90% de inibição do crescimento das lentilhas-d'água e da cultura de células em suspensão. A cultura de algas é a menos sensível aos compostos testados verificando-se que apenas as asteriscunolidas A e C inibem significativamente o seu crescimento (50-90%). Salienta-se a inibição total da cultura de células em suspensão pelas asteriscunolidas C e D; esta última tem efeito idêntico na cultura de lentilhas-d'água. O composto **70** tal como os ésteres metílicos **36a**, **37a** e **38a** evidenciam uma actividade fitotóxica muito fraca.

Relativamente à acção antitumoral, destacam-se claramente as três asteriscunolidas com valores de  $IC_{50}$  muito significativos, inferiores ao da cisplatina. Os compostos **36a**, **37a** e **38a** e **70** têm efeito citotóxico considerado fraco.

É possível que a actividade agora determinada esteja relacionada com o grupo carbonilo- $\alpha,\beta$ -insaturado que poderá actuar como aceitador de Michael, à semelhança das lactonas sesquiterpénicas com um grupo lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. No entanto, a actividade biológica das asteriscunolidas não pode ser atribuída unicamente à presença do grupo lactona que também existe no composto **70**, notoriamente menos activo. É razoável supor que a actividade citotóxica das asteriscunolidas depende também da presença das ligações duplas em C-6 e C-9, que não se encontram na estrutura do composto **70**.

## 2.4 Conclusões finais

O estudo da actividade biológica dos extractos de *S. sclareoides* levou à detecção de actividades importantes do ponto de vista da terapêutica de doenças degenerativas, nomeadamente, actividade anticolinesterásica e actividade antioxidante consideradas relevantes no tratamento da doença de Alzheimer. O extracto em acetona evidenciou maior actividade anticolinesterásica, quer em relação à acetilcolinesterase, quer em relação à butirilcolinesterase, suplantando os valores descritos para outras plantas com propriedades anticolinesterásicas. O estudo fitoquímico deste extracto permitiu identificar entre os seus constituintes maioritários o ácido ursólico, entretanto caracterizado como bom inibidor da butirilcolinesterase. A ausência de toxicidade do extracto, de acordo com os testes realizados, constitui uma vantagem relativamente a compostos usados para o tratamento da doença de Alzheimer que apresentam efeitos secundários adversos. Outro ponto de interesse da planta estudada reside no seu potencial antioxidante bem como na



presença de flavonóides no seu conteúdo fenólico, mais precisamente da quercetina, cujas propriedades antioxidantes lhe conferem grande interesse terapêutico. O conjunto dos resultados decorrentes do estudo de *S. sclareoides* sugere que o potencial medicinal desta planta deve ser investigado futuramente, nomeadamente no que respeita à sua utilização como alimento funcional e como fonte de fármacos para doenças neurodegenerativas.

O estudo das fracções biologicamente activas obtidas do extracto de *A. vogelii* levou ao isolamento e identificação de lactonas sesquiterpénicas do tipo humulanolida, designadamente as asteriscunolidas, como agentes responsáveis pela actividade biológica detectada. Salienta-se a actividade antitumoral em diversas linhas celulares, superior à da cisplatina usada como padrão. Este trabalho pioneiro demonstra o potencial deste tipo de compostos para o controlo de doenças oncológicas bem como o interesse em prosseguir o estudo da sua possível aplicação terapêutica.



### **3. PARTE EXPERIMENTAL**



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiais e métodos

##### 3.1.1 Cromatografia

Recorreu-se a CLC para separar os extractos e as fracções em quantidades superiores a 60 mg. A separação de misturas mais simples em quantidade igual ou inferior bem como a purificação final de alguns compostos foi efectuada por meio de CCF<sub>prep.</sub>. Os extractos e as fracções recolhidas foram analisados por CCF<sub>an.</sub>. Esta técnica permitiu acompanhar a evolução do fraccionamento e avaliar o grau de pureza dos compostos isolados.

##### 3.1.1.1 Solventes para cromatografia

A preparação dos extractos vegetais, a CLC e a CCF<sub>an.</sub> foram efectuadas com solventes puros Riedel-de-Häen. A CCF<sub>prep.</sub> e a extracção dos compostos da sílica foram realizadas com solventes Merck *p.a.*

##### 3.1.1.2 Sílica e placas para cromatografia

Foi utilizada sílica-gel Merck 230–400 mesh para o enchimento das colunas. Foram usadas placas de vidro com cobertura de sílica-gel Merck PF<sub>254</sub> (0.50 mm) para CCF<sub>prep.</sub> e placas de alumínio com cobertura de sílica-gel 60 PF<sub>254</sub> (0.2 mm) para CCF<sub>an.</sub>.

##### 3.1.2 Observação dos cromatogramas

Após a secagem das placas de CCF<sub>an.</sub>, procedeu-se à observação dos cromatogramas com luz UV (254 nm), usando uma lâmpada UV CAMAG. A revelação dos cromatogramas foi efectuada com uma solução de vanilina em

ácido sulfúrico concentrado (3% de vanilina em ácido sulfúrico), pulverizada sobre a placa que era depois aquecida na estufa a 100 °C.

### 3.1.3 HPLC – DAD

Foi usado um sistema Agilent 1100 Series LC Agilent Technologies constituído pelos seguintes módulos: degaseificador de vácuo G1322A, bomba quaternária G1311A, dispensador automático de amostras G1313, compartimento termostaticado para coluna G1316A e detector de díodos G1315A. A aquisição de dados e o controlo instrumental foram efectuadas por meio de *software* LC3D ChemStation (versão Ver.A.10.0 [1757] Agilent Technologies). As análises foram realizadas numa coluna Mediterranean Sea 18, de 150 mm x 2.1 mm de diâmetro interno, com partículas de 5 µm, Teknokroma.

### 3.1.4 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram medidos num aparelho digital Electrothermal.

### 3.1.5 Espectroscopia

#### 3.1.5.1 Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram dissolvidas em CDCl<sub>3</sub> e/ou em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> e foi usado TMS como padrão interno.

Os espectros de <sup>1</sup>H-NMR (400.1 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz), DEPT, HMBC, HMQC, COSY E NOESY dos compostos isolados de *S. sclareoides* foram obtidos num aparelho Bruker ARX 400.

Os espectros de <sup>1</sup>H-NMR a 200 MHz, 250 MHz e 400 MHz dos compostos isolados de *A. Vogelii* foram realizados em aparelhos Bruker AC 200, Bruker AC

250 P e Bruker AMX 400, respectivamente. O aparelho Bruker AC 250 P foi também usado na obtenção dos espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR.

### **3.1.5.2 Infravermelho**

Os espectros de IV foram realizados em espectrofotómetros HITACHI 270-5 (compostos isolados de *S. sclareoides*) e Mattson Satellite FT-IR (compostos isolados de *A. vogelii*), usando células de líquidos.

### **3.1.5.3 Ultravioleta/luz visível**

Foram utilizados aparelhos Perkin-Elmer 402 com a amostra dissolvida em EtOH para a caracterização dos compostos de *A. vogelii*. O espectrofotómetro Shimadzu® foi utilizado para quantificar o conteúdo total de fenóis (765 nm), determinar a actividade anticolinesterásica (412 nm) e a actividade antioxidante pelos métodos de DPPH (517 nm) e de  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (470 nm).

### **3.1.6 Espectrometria de Massa**

Os espectros de massa foram obtidos em espectrómetros Hewlett-Packard 5930 (70 eV) e Micromass VG ZAB-2F (espectrometria de alta resolução).

### **3.1.7 Preparação dos extractos**

#### **3.1.7.1 Extractos de *S. sclareoides***

A parte aérea de *S. sclareoides* foi colhida na região da foz do rio Lizandro, Mafra, Portugal, em Maio e, após secagem em ambiente seco ao abrigo da luz, foi triturada.

#### **3.1.7.1.1 Preparação do extracto em Me<sub>2</sub>CO**

O material vegetal (280 g) foi extraído com acetona (10 L), à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, a 40° C, sob vácuo, foi obtido o extracto em acetona (11 g).

#### **3.1.7.1.2 Preparação do extracto em EtOH**

O material vegetal (280 g) foi extraído com EtOH (1L) à temperatura ambiente. Após evaporação do EtOH, sob vácuo, a 40° C, obteve-se o extracto etanólico (3 g).

#### **3.1.7.1.3 Preparação dos extractos em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, BuOH e água**

O material vegetal (100 g) foi extraído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 L), à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, sob vácuo, a 40° C, foi obtido o extracto em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 g).

Após extracção com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, o material vegetal foi sequencialmente extraído primeiro com MeOH (1,5 L), tendo sido obtido, após evaporação, sob vácuo, a 40° C, o extracto metanólico (5 g), e seguidamente com uma solução aquosa de MeOH 50% (1,5 L). Após a evaporação do MeOH fez-se a extracção da fase aquosa com BuOH (1 L), tendo sido obtido, após evaporação do solvente, sob vácuo, o extracto butanólico (3 g).

A concentração da fase aquosa até à secura permitiu obter o extracto aquoso (7,8 g).



### 3.1.7.2 Extractos de *A. vogelii*

A parte aérea de *A. vogelii* (2,1 kg) foi colhida na zona costeira da ilha de Santiago, em Cabo Verde e, após secagem em meio seco, no escuro, foi triturada e extraída (1,0 kg) com  $\text{CHCl}_3$  (5 L), à temperatura ambiente. O extracto (37 g) foi obtido após evaporação do solvente a 40 °C, sob vácuo. As escassas quantidades de alguns dos compostos isolados deste extracto impediram a realização de novos testes de novos testes de actividade biológica com o objectivo de identificar os agentes responsáveis pela acção fitotóxica das fracções, pelo que a restante quantidade de planta (1,1 kg) foi também extraída com  $\text{CHCl}_3$  (5 L), utilizando as mesmas condições, dando origem ao segundo extracto (40 g).

### 3.1.8 Fraccionamento dos extractos e fracções

#### 3.1.8.1 *S. sclareoides*

##### 3.1.8.1.1 Extracto em $\text{Me}_2\text{CO}$

O extracto em  $\text{Me}_2\text{CO}$  foi fraccionado por CLC, usando misturas de EtOAc/benzeno de polaridade crescente. Foram recolhidas cerca de 100 fracções que, após análise por  $\text{CCF}_{\text{an.}}$ , foram re combinadas em cinco fracções principais A, B, C, D e E. Estas foram posteriormente submetidas a CLC seguida de  $\text{CCF}_{\text{prep.}}$  para isolar os constituintes maioritários. Foi usada  $\text{Me}_2\text{CO}$  para extrair os compostos da sílica.

##### 3.1.8.1.2 Fracção A

A fracção A (145 mg), resultante da eluição do extracto com EtOAc/benzeno (1:7), foi submetida a CLC usando uma mistura de EtOAc/hexano (1:4) como eluente. Por meio desta cromatografia foram obtidos o ácido ursólico (**22**,

20 mg) e uma mistura de compostos que foi metilada e separada por CCF<sub>prep.</sub> com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (40:1), permitindo assim isolar o éster metílico do ácido ursólico (**22a**, 3 mg) e nepeticina (3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-ene-3,11-diol, **54**) (8 mg).

#### 3.1.8.1.3 Fracção B

A fracção B (340 mg) foi obtida por eluição do extracto com EtOAc/benzeno (1:4). Depois de metilada com diazometano, foi sujeita a CLC com EtOAc/hexano (1:4), originando 4 fracções: B<sub>1</sub> (25 mg), B<sub>2</sub> (56 mg), B<sub>3</sub> (20 mg) e B<sub>4</sub> (21 mg). Após purificação da fracção B<sub>1</sub> por CCF<sub>prep.</sub> com EtOAc/hexano (1:4), foi isolado o éster metílico do ácido ursólico (**22a**, 13 mg). Da fracção B<sub>2</sub> foram isolados, por CCF<sub>prep.</sub>, usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (20:1) como eluente, os seguintes compostos: 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**56**, 11 mg) e 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**, 32 mg). A fracção B<sub>3</sub> era constituída maioritariamente pelo composto 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**, 20 mg). Os constituintes da fracção B<sub>4</sub> foram separados por CCF<sub>prep.</sub>, com uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (10:1) e identificados como o 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (**52**, 5 mg) e 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**, 3 mg).

#### 3.1.8.1.4 Fracção C

A fracção C (300 mg) resultou da eluição do extracto com EtOAc/benzeno (1:4) e foi submetido a CLC, utilizando uma mistura de EtOAc/tolueno (1:4) como eluente. As fracções assim obtidas foram re combinadas e, após purificação por CCF<sub>prep.</sub> com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (10:1), foram isolados os compostos 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -di-hidroxi-lup-20(29)-ene-1,3-diol (**55**, 20 mg) e ácido ursólico (**22**, 15 mg).

#### 3.1.8.1.5 Fracção D

A fracção D (460 mg), resultante da eluição do extracto com EtOAc/benzeno (1:2), foi separada em duas fracções principais por CLC fazendo a eluição com EtOAc/hexano (5:2). Os constituintes maioritários destas fracções foram separados por CCF<sub>prep.</sub>, utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (20:1) como eluente, tendo sido identificados como o ácido sumaresinólico (ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ - di-hidroiolean-12-en-28-óico, **57**) (1 mg) e a hederagenina (ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroiolean-12-en-28-óico, **58**) (13 mg).

#### 3.1.8.1.6 Fracção E

A fracção E (203 mg), obtida por eluição do extracto com EtOAc, continha um composto maioritário que foi isolado por CCF<sub>prep.</sub>, com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ EtOH (10:1). Este composto, obtido na quantidade de 64 mg, foi identificado como sendo a nepetidina (1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -tri-hidroxi-lup-20(29)-ene-1,3,11-triol, **53**).

#### 3.1.8.2 *A. vogelii*

O fraccionamento do primeiro extracto (37 g) por CLC foi iniciado com uma mistura de EtOAc/ hexano (1:8), tendo sido aumentada progressivamente a polaridade do eluente até se utilizar apenas EtOAc. Foram assim obtidas 30 fracções das quais apenas 14 se apresentavam em quantidade suficiente para realizar os testes de actividade biológica (fitotóxica, antifúngica e insecticida). As fracções biologicamente activas seleccionadas foram depois separadas nos seus constituintes por métodos cromatográficos.

##### 3.1.8.2.1 Fracção (F+G)

A observação mais detalhada dos cromatogramas analíticos destas fracções levou à conclusão de que conteriam os mesmos compostos maioritários pelo que foram reunidas numa única fracção (1,5 g) que foi submetida a CLC com

uma mistura de EtOAc/n-hexano (1:10). As fracções assim obtidas foram posteriormente sujeitas a CCF<sub>prep.</sub>, usando EtOAc/n-hexano (1:2) como eluente, o que permitiu isolar a asteriscunolida A (**32**, 131 mg).

#### 3.1.8.2.2 Fracção I+J

Por motivo idêntico ao exposto no ponto anterior, as fracções I e J foram reunidas numa única fracção (3,7 g) que foi separada por CLC, usando uma mistura de Et<sub>2</sub>O/éter de petróleo (2:1). Desta separação resultaram duas fracções principais. A primeira fracção foi submetida a CLC, usando Et<sub>2</sub>O/éter de petróleo (2:1) para a eluição, o que permitiu isolar a asteriscunolida C (**34**, 104 mg) e a asteriscunolida D (**35**, 70 mg). A segunda fracção era constituída por uma mistura de ácidos que apenas foram reconhecidos pela interpretação do seu espectro de <sup>1</sup>H-NMR dado que na placa de CCF<sub>an.</sub> estes dois compostos apareciam sobrepostos numa única mancha. Efectuou-se então a metilação desta mistura com diazometano conseguindo-se separar facilmente os seus componentes na forma de ésteres metílicos por meio de CCF<sub>prep.</sub> e usando EtOAc/hexano (1:4) para a eluição. Os ésteres metílicos foram identificados como o (2*Z*,6*Z*,9*E*)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (**36a**, 5 mg) e (2*Z*,6*E*,9*Z*)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (**37a**, 7 mg).

#### 3.1.8.2.3 Fracção P

Esta fracção não foi usada em testes de actividade biológica mas, por ter uma composição semelhante à da fracção I+J foi sujeita a cromatografia com o objectivo de obter maior quantidade dos compostos desejados. Assim, procedeu-se à separação dos compostos maioritários da fracção P (1,6 g) por CLC, usando para a eluição uma mistura de Et<sub>2</sub>O/éter de petróleo (3:1). Numa das fracções foi reconhecida a existência de uma mistura idêntica à mistura de ácidos referida no ponto anterior, pelo que se efectuou a sua metilação. Por meio de CCF<sub>prep.</sub> usando para a eluição uma mistura de EtOAc/hexano (1:8), foi possível isolar os compostos **36a** (4 mg) e **37a** (3 mg). Outro grupo de

fracções foi também metilado e separado por CLC com EtOAc/hexano (1:6), seguida de purificação por CCF<sub>prep.</sub> o que permitiu isolar um terceiro isómero inexistente nas fracções anteriores, cuja estrutura corresponde à do éster (2*Z*,6*E*,9*E*)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (**39a**, 11 mg).

#### 3.1.8.2.4 Fraccionamento do segundo extracto

A separação deste segundo extracto foi efectuada de acordo com o procedimento descrito para o primeiro extracto. O composto (2*Z*)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida (**70**, 35 mg) foi isolado, por meio de recristalização, das fracções que continham a asteriscunolidas.

#### 3.1.9 Metilação das fracções

##### 3.1.9.1 Preparação do diazometano

Dissolveu-se diazalde (*N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenosulfonamida, 6,42 g) em Et<sub>2</sub>O (90 mL) de e dissolveu-se KOH (1,2 g) em EtOH (30 mL). A solução de KOH foi vertida, gota a gota, a 0 °C, sobre a solução de diazalde e a mistura foi depois destilada a 30 °C, obtendo-se assim uma solução de diazometano em Et<sub>2</sub>O. Esta solução deve ser preparada na *hotte* utilizando, se possível, um equipamento de vidro específico para o efeito, uma vez que o diazometano é altamente tóxico por inalação ou contacto com a pele (TLV 0,2 ppm) e carcinogénico.

##### 3.1.9.2 Procedimento

A metilação foi efectuada com a solução de diazometano em Et<sub>2</sub>O que se adicionou, em excesso, directamente às amostras, previamente dissolvidas em Et<sub>2</sub>O. Esta reacção foi realizada no escuro, à temperatura ambiente. A evaporação posterior do solvente permitiu obter o resíduo metilado.

### 3.1.10 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Folin e Ciocalteu, 1927; Singleton *et al.*, 1999; Miliauskas *et al.* 2004) e por meio de HPLC – DAD.

#### 3.1.10.1 Método de Folin-Ciocalteu

##### 3.1.10.1.1 Soluções para o traçado da curva de calibração

Foram usadas alíquotas de solução aquosa de ácido gálico (20 µL) com as concentrações de 0,024, 0,075, 0,105, 0,150 e 0,180 mg/mL, às quais foi adicionado reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção de 1/10 (100 µL) e solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 % (p/v, 80 µL).

##### 3.1.10.1.2 Realização do ensaio

Foram usadas alíquotas de solução de extracto (20 µL) à qual foi adicionado reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água na proporção de 1/10 (100 µL) e solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5 % (p/v, 80 µL). A absorvância a 765 nm foi medida após uma hora. Estes ensaios foram realizados em triplicado.

##### 3.1.10.1.3 Cálculo do conteúdo total de fenóis

O conteúdo total de fenóis, expresso em GAE, foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$C = (c \times V) / m$$

C = conteúdo total de fenóis (mg GAE/g de extracto);

c = concentração de ácido gálico determinada a partir da curva de calibração (mg GA/mL);

V = volume de solução de ácido gálico ou de solução extracto vegetal (20  $\mu$ L);  
m = massa de extracto seco (g).

### **3.1.10.2 HPLC – DAD**

#### **3.1.10.2.1 Reagentes e padrões**

Foram utilizados os seguintes reagentes e padrões: MeOH (99,9%) grau HPLC (Merck), ácido acético (99,8%) (Riedel-de-Häen), ácido cafeico, ácido sirínico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido cumárico, ácido vanílico, hidrato de catequina e hidrato de rutina (Sigma-Aldrich), ácido clorogénico e glucósido de canferol (Extrasynthèse) e água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Millipore.

#### **3.1.10.2.3 Preparação das amostras e dos padrões**

As soluções de padrões (1 mg/mL) e de extractos foram preparadas com MeOH grau HPLC e conservadas no escuro, a -4  $^{\circ}$ C.

#### **3.1.10.2.3 Condições da análise**

A fase móvel consistiu numa mistura de MeOH (solvente A) e solução aquosa de ácido acético 25% (solvente B). O gradiente aplicado foi de 0-50 min: 30-80% A; 50-55 min: 80-30% A e mantido a 30% A durante 5 min com um fluxo de 0.5 mL/min. As análises foram feitas a 25  $^{\circ}$ C, tendo sido injectado um volume de amostra de 10  $\mu$ L com uma velocidade de injeção de 200  $\mu$ L/min. A detecção foi efectuada a 280 nm. Para efeitos de identificação compararam-se os parâmetros de retenção de cada extracto com os dos padrões usados para controlo e o pico de pureza com os dados dos espectros de UV/visível.

### **3.1.11 Actividade biológica**

#### **3.1.11.1 Actividade fitotóxica – 1ª Fase**

Plantas jovens foram pulverizadas com uma solução aquosa de extracto (7,5 mg/mL) e colocadas na estufa durante sete dias, ao fim dos quais foram determinados os resultados, tendo como padrão de comparação um grupo de plantas não pulverizadas. Esta determinação consistiu, quer numa avaliação quantitativa do crescimento, quer numa avaliação qualitativa de sintomas como, por exemplo, existência de necroses, clorose e deformação de folhas.

#### **3.1.11.2 Actividade fitotóxica – 2ª Fase**

Nestes testes foram utilizadas soluções de extracto/fracção em MeOH (6 mg/mL).

O parâmetro escolhido para determinar os resultados foi o crescimento total, tomando o controlo como padrão de comparação, ao qual corresponde um crescimento de 100%. Os valores obtidos traduzem a actividade biológica dos extractos em termos de percentagem de inibição do crescimento.

As espécies seleccionadas para os testes foram as seguintes: lentilha-d'água (*Lemna paucicostata*), feto aquático azola (*Azolla filiculoides*) e algas unicelulares *Scenedesmus acutus*.

##### **3.1.11.2.1 Testes com *Lemna paucicostata***

Colocaram-se quatro exemplares de lentilhas-d'água numa tina de vidro contendo meio de cultura (25 mL) ao qual foi adicionada a solução de extracto/fracção (250 µL). Seguiu-se a incubação numa câmara de cultura, durante 3 dias, a 27 °C, com 75% de humidade no ar e sob uma intensidade



luminosa de 5000 Lux. Findo este período procedeu-se à quantificação do crescimento com base na medição da área total da colónia.

O controlo foi efectuado com lentilhas-d'água cultivadas em meio de cultura e metanol.

#### **3.1.11.2.2 Testes com *Azolla filiculoides***

Adicionou-se solução de extracto/fracção (1,5 mL) a meio de cultura (150 mL) no qual se distribuiu uniformemente a azola (400 mg). Esta preparação foi mantida na estufa, à luz (20000 Lux), a 25 °C e com 85% de humidade no ar, durante 15 dias, ao fim dos quais se fez a observação dos resultados.

Nos testes de controlo utilizou-se apenas meio de cultura no qual se colocou a azola.

#### **3.1.11.2.3 Testes com *Sinapis alba***

Utilizou-se a parte aérea (caule e folhas cotiledonares) de plântulas de mostarda branca que foram colocados em água (12 mL) à qual se adicionou a solução de extracto/fracção (120 µL). Estas preparações foram incubadas a 23°C, com 75% de humidade no ar e sob uma intensidade luminosa de 18000 a 23000 Lux, por um período de 3 dias. Terminado este período avaliou-se o crescimento da cultura por meio da determinação da variação de peso fresco.

O controlo foi efectuado usando apenas água como meio de cultura.

#### **3.1.11.2.4 Testes com *Scenedesmus acutus***

Colocou-se suspensão de algas (1 mL) (com a concentração de 1000 células/mL) no meio de cultura (1 mL) ao qual se adicionou a solução de extracto/fracção (10 µL) e solução-tampão (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NaHCO<sub>3</sub>) (500 µL) que

actua como fornecedor de CO<sub>2</sub>. As preparações foram incubadas à luz (10000 Lux), a 23 °C, com agitação, durante 24 horas. O crescimento total das culturas foi determinado por meio de contagem de células.

O ensaio de controlo foi realizado com algas cultivadas em meio de cultura.

### **3.1.11.3 Actividade antifúngica**

Preparou-se uma solução de extracto/fracção (100 mg) em acetona (10 mL) que foi seguidamente diluída em água bidestilada e esterilizada até à concentração final de 0.1% (p/v). As espécies vegetais (pimentão doce, arroz e trigo) foram pulverizadas com esta solução (50 mL) e, após 24 horas, foram inoculadas com uma suspensão de esporos de fungos e incubadas na estufa por um período de 7 dias. Cada espécie foi inoculada com uma única espécie de fungo. Este tipo de teste foi realizado com o objectivo de averiguar o efeito protector dos extractos/fracções.

Os extractos e fracções foram ainda aplicados num segundo ensaio em que não se efectuou a inoculação das plantas com os fungos; este teste tinha por finalidade averiguar possíveis efeitos fitotóxicos dos extractos estudados.

Os testes de controlo foram realizados com plantas inoculadas com fungos mas não pulverizadas com os extractos/fracções.

A actividade antifúngica dos extractos foi avaliada em percentagem de inibição do crescimento, tomando como padrão de comparação os resultados observados em plantas pulverizadas com soluções *standard*, a que corresponde uma inibição de 100%.

#### **3.1.11.4 Actividade insecticida**

Por meio destes testes avaliou-se o efeito dos extractos em diversas espécies de insectos: adultos e larvas de *Prodenia litura*, insecto que infesta diversas culturas e é conhecido como a larva do algodoeiro, afídios *Aphis fabae* (piolho-negro-da-fava) e larvas de *Plutella maculipennis* (lagarta verde da couve). Os extractos foram dissolvidos em Me<sub>2</sub>CO com uma concentração de 0,04 %. Todos os resultados foram determinados em percentagem de mortalidade de insectos.

##### **3.1.11.4.1 Testes com *Prodenia litura***

Depositou-se a solução de extracto (1 mL) numa folha de papel de filtro com 9 cm de diâmetro sobre a qual foram também colocadas 5 larvas. Os resultados foram observados após 24 horas.

O ensaio destinado a averiguar o efeito dos extractos em insectos adultos foi realizado segundo o mesmo método, substituindo as larvas por adultos.

##### **3.1.11.4.2 Testes com *Aphis fabae***

Quatro plântulas de faveira infestadas com afídios foram pulverizadas com a solução de extracto (30 mL) e mantidas na estufa por 24 horas ao fim das quais se fez a análise dos resultados.

##### **3.1.11.4.3 Testes com *Plutella maculipennis***

Sobre uma folha de papel de filtro molhada com água destilada (1 mL) colocou-se um círculo de folha de couve previamente lavado em solução de extracto em acetona, a 0,1%. Nesta montagem foram também colocadas 5 larvas. A determinação dos resultados foi efectuada ao fim de dois dias.

### 3.1.11.5 Actividade anticolinesterásica

Este ensaio foi realizado de acordo com o método de Ellman (1961).

#### 3.1.11.5.1 Enzimas e Reagentes

Foram utilizados ATchI, BTchI, DTNB, hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sódio (KOH) e hidrogenocarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), AChE extraída de eritrócitos humanos e BChE extraída do soro humano (Sigma-Aldrich). As soluções-tampão pH 8,0, as soluções de substrato e de DTNB foram preparadas com água esterilizada e desionizada.

#### 3.1.11.5.2 Preparação das soluções

As soluções a seguir indicadas foram colocadas em tubos de Eppendorf (alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ ) e conservadas no frigorífico, após a sua preparação.

- **Tampão fosfato pH 8,0, 0,1 M:** dissolveu-se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (136,1 mg) em água (10 mL) e adicionou-se KOH até ao pH  $8,0 \pm 0,1$ .
- **Solução de AChE 1,32 U/mL:** diluiu-se solução de enzima 1,02041 U (10  $\mu\text{L}$ ) em tampão-fosfato até perfazer o volume de 0,773 mL.
- **Solução de BChE 0,44 U/mL:** dissolveu-se enzima 2,9762 U (1,0 mg) em tampão-fosfato (6,764 mL).
- **Solução de DTNB 0,01 M:** dissolveu-se DTNB (3,96 mg) em água (1 mL) na qual se tinha previamente dissolvido  $\text{NaHCO}_3$  (1,5 mg).
- **Solução de ATchI 0,022 M:** dissolveu-se ATchI (6,4 mg) em água (1 mL).
- **Solução de BTchI 0,022 M:** dissolveu-se BTchI (7,0 mg) em água (1 mL).

- **Soluções de extractos e de rivastigmina:** os extractos e a rivastigmina foram dissolvidos em tampão-fosfato pH 8,0 em concentrações variáveis de 10,73 a 1073 µg/mL de forma a obter uma concentração final de 10 a 1000 µg/mL.

### 3.1.11.5.3 Realização dos ensaios com AChE e BChE

Foi colocada numa *cuvette* a solução de enzima (5 µL), a solução de extracto (205 µL) e a solução de DTNB (5 µL). O substrato (5 µL) foi adicionado após o aquecimento da mistura a 30 °C durante 15 minutos. A absorvância foi determinada num período de reacção de 4 minutos, a 30 °C.

As concentrações finais das soluções usadas foram as seguintes: [AChE] = 0,03 U/mL, [BChE] = 0,01 U/mL, [extractos] de 10 a 1000 µg/mL, [DTNB] = 0.0002273 M, [ATchI] = [BTchI] = 0,0005 M.

### 3.1.11.5.4 Cálculo da inibição enzimática

A actividade enzimática (%) e a inibição enzimática (%) foram determinadas a partir da variação da absorvância, de acordo com a seguinte relação:

$$V = \Delta \text{Abs} / \Delta t$$

$$\text{Actividade enzimática (\%)} = 100 \times V / V_{\text{máx}}$$

sendo  $V$  a velocidade de reacção na presença de um inibidor e  $V_{\text{máx}}$  a velocidade da reacção na ausência de inibidor e

$$\text{Inibição enzimática (\%)} = 100 - \text{Actividade enzimática (\%)}$$

Foram realizados ensaios na ausência de extracto para determinar a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ), bem assim como ensaios sem extracto nem enzima para averiguar a ocorrência de hidrólise não-enzimática do substrato.

#### **3.1.11.5.5 Análise estatística dos dados**

Foi realizado o *t*-teste com o objectivo de verificar se a inibição enzimática pelos extractos de *S. sclareoides* (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) e se o controlo positivo com a rivastigmina são significativamente mais elevados do que os valores obtidos na ausência de inibidor (0%).

#### **3.1.11.6 Actividade antioxidante**

##### **3.1.11.6.1 Reagentes**

Utilizaram-se ácido linoleico, β-caroteno, DPPH, Tween 40, DMSO, MeOH, CHCl<sub>3</sub>, BHT e ácido ascórbico (Sigma-Aldrich).

##### **3.1.11.6.2 Ensaio pelo método de DPPH**

A actividade antioxidante foi determinada de acordo com o método descrito por Blois (1958) e Ozgen (Ozgen *et al.*, 2006).

##### **3.1.11.6.2.1 Soluções de extractos**

Os extractos (20 mg) foram dissolvidos em MeOH (1 mL) excepto o extracto aquoso que foi dissolvido em água ultrapura (1 mL).

##### **3.1.11.6.2.2 Solução de DPPH**

Preparou-se uma solução de DPPH em MeOH 0,27 mM.

### 3.1.11.6.2.3 Realização do ensaio

Foi adicionada a solução de extracto (15 µL) à solução de DPPH (185 µL) colocada numa *cuvette* de plástico Plastibrand, e agitou-se vigorosamente. Após 30 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância a 517 nm. Este ensaio foi realizado em triplicado.

As concentrações finais das soluções utilizadas foram as seguintes: [extractos] de 1 a 500 µg/mL, [DPPH] = 0,25 mM.

O controlo positivo foi efectuado com uma solução aquosa de ácido ascórbico e com uma solução de BHT em MeOH, em concentrações idênticas às das soluções de extractos, seguindo o procedimento descrito. O controlo negativo foi efectuado com o meio de reacção na ausência de extracto, de BHT ou de ácido ascórbico.

### 3.1.11.6.2.4 Cálculo da actividade antioxidante

A actividade antioxidante foi calculada pela seguinte relação:

$$\text{Efeito de captação do radical DPPH (\%)} = [(Abs_{c.neg.} - Abs_{ext.} / Abs_{c.neg.}] \times 100$$

$Abs_{c.neg.}$  é a absorvância medida no ensaio de controlo negativo e  $Abs_{ext.}$  é a absorvância medida no ensaio com o extracto.

### 3.1.11.6.3 Ensaio pelo método β-caroteno/ácido linoleico

A actividade antioxidante foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Miller (1971).

### **3.1.11.6.3.1 Soluções de extractos**

Os extractos em Me<sub>2</sub>CO, EtOH, BuOH e BuOH foram dissolvidos em DMSO e o extracto aquoso foi dissolvido em água destilada de forma que a concentração final das soluções usadas para os ensaios variasse entre 1 e 500 µg/mL.

### **3.1.11.6.3.2 Solução de β-caroteno/ácido linoleico**

Foi preparado o meio de reacção constituído por uma solução de β-caroteno (0.2 mg) dissolvido em clorofórmio (1 mL), ácido linoleico (22 µL) e Tween 40 (200 mg). Após a evaporação do clorofórmio num evaporador rotativo adicionou-se água saturada de oxigénio (40 mL) e agitou-se vigorosamente.

### **3.1.11.6.3.3 Realização do ensaio**

O meio de reacção (2 mL) foi colocado num tubo juntamente com solução de extracto (0,5 mL). Durante um período de incubação de 2 horas, a 50 °C, mediu-se a absorvância a 470 nm. Este ensaio foi realizado em duplicado.

As concentrações finais das soluções usadas foram as seguintes: [extractos] de 1 a 500 µg/mL, [β-caroteno] = 4 µg/mL e [ácido linoleico] = 400 µg/mL.

O controlo positivo foi efectuado com uma solução aquosa de ácido ascórbico e com uma solução de BHT em DMSO, em concentrações idênticas às das soluções de extractos, seguindo o procedimento descrito. O controlo negativo foi efectuado com o meio de reacção na ausência de extracto, de BHT ou de ácido ascórbico.



### 3.1.11.6.3.4 Cálculo da actividade antioxidante

A actividade antioxidante (AA) foi calculada por meio da seguinte relação:

$$AA (\%) = [R_{c.neg.} - R_{ext.} / R_{c.neg.}] \times 100$$

$R_{c.neg.}$  e  $R_{ext.}$  são as taxas de oxidação do controlo negativo e dos extractos.

O valor de R é determinado a partir da relação  $\ln (Abs) = \ln (Abs_0) + R \times t$ , correspondendo ao declive de  $\ln (Abs)$  vs.  $t$  (min) o qual pode ser calculado por regressão linear.

### 3.1.11.7 Testes de toxicidade

#### 3.1.11.7.1 Toxicidade aguda

A toxicidade dos extractos estudados foi determinada pelo método MTT que é um método colorimétrico que permite avaliar a viabilidade celular na presença ou ausência de extracto (Plumb *et al.*, 1989) adaptado a células em suspensão (Young *et al.*, 2005). Procedeu-se à cultura de uma suspensão de células (leucemia humana K562) em placas de ELISA 96 durante 24 horas. No final deste período adicionaram-se os extractos deixando-os actuar durante 48 horas. Seguidamente, aplicou-se a solução de MTT (0,5 mg/mL) (10 µL) seguindo-se um período de incubação de 3 horas. Os cristais de formazano entretanto formados foram solubilizados em DMSO (100 µL), sob agitação, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 550 nm num espectrofotómetro de *scanning*, usando como referência o comprimento de onda de 620 nm.

O controlo positivo realizou-se com peróxido de hidrogénio e o controlo negativo foi efectuado usando apenas o solvente puro.

### 3.1.11.7.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada por meio dos ensaios *in vitro* com vista a determinar aberrações cromossómicas (Rueff *et al.*, 1993). Linfócitos sanguíneos provenientes de dadores saudáveis foram incubados durante 24 horas expostos a uma solução de fito-hematoglutina (2% v/v) com o objectivo de induzir a proliferação celular. As culturas foram expostas à acção dos extractos durante 24 horas, após as quais se adicionou uma solução de colcemida (0,5 µg/mL) que se deixou actuar durante 3 horas, inibindo assim a mitose na metáfase. Procedeu-se depois à observação das células ao microscópio óptico (1250 x) fazendo a análise de 100 metafases completas (46 centrómeros presentes). A classificação das aberrações cromossómicas foi feita pelo critério definido por Rueff *et al.* (1993) e foi também determinado o índice mitótico (número de células em mitose por cada 1000 células contadas).

### 3.1.11.8 Actividade antitumoral

A acção dos compostos isolados de *A. vogelii* como agentes antineoplásicos foi avaliada pelo método descrito por Shroeder *et al.* (1981) e Bergeron *et al.* (1984). As linhas celulares seleccionadas foram as seguintes: P-388 de linfoma de ratos (cultura de células em suspensão), e cultura em monocamada de células A-549 do carcinoma do pulmão humano, HT-29 do carcinoma do cólon humano e do melanoma humano MEL-28 (culturas em monocamada).

As culturas de células foram mantidas na fase logarítmica de crescimento em EMEM/nea e L-glutamina (2 mM) sem bicarbonato de sódio, com um suplemento de FCS (5%),  $10^{-2}$  M bicarbonato de sódio, penicilina G (0,1 g/L) e sulfato de estreptomicina (0,1 g/L).

Os ensaios foram realizados com suspensões de células ( $1-2 \times 10^4$  células por poço) em alíquotas (1 mL) de meio de cultura (EMEM 5% FCS) misturado com

as soluções dos compostos a testar. Após 3 dias de incubação, a 37 °C, 10% de CO<sub>2</sub>, e 98% de humidade, retirou-se uma amostra das culturas que foi fixada em formalina (4%) e contrastada com solução violeta de cristal (1%).

O índice IC<sub>50</sub> foi determinado por comparação com os resultados obtidos com a cisplatina (Faircloth *et al.*, 1988).

## 3.2 Características físicas e espectroscópicas dos compostos isolados

### 3.2.1 *S. sclareoides*

#### 3.2.1.1 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (70)

Cristais incolores, p.f. 276-278 °C;  $[\alpha]_D^{25}$  -7 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3600 (OH), 1618 (C=CH<sub>2</sub>, isopropenilo).

EIMS *m/z* (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>, 458), 440 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, (4), 422 [M-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (5), 406 [M-2H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup>, (2), 219 (7), 207 (6), 203 (9), 189 (6), 187 (9), 175 (13), 149 (26), 55 (100).

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMQC: Tabela 5.

NOESY: figura 19.

**3.2.1.2 Nepetidina [1 $\beta$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-1,3,11-triol, 53]**

Agulhas incolores, p.f. 290 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3584 (OH), 1642, 890 (C=CH<sub>2</sub>, isopropenilo).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>, 458), 458 [M]<sup>+</sup> (8), 440 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (40), 425 [M-H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup> (14), 389 [M-3H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup> (2), 325 (100), 255 (9), 229 (13), 217 (14), 203 (38), 189 (20), 175 (22).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  4,66 (1H, *br s*, H-29a), 4,54 (1H, *br s*, H-29b), 3,85 (1H, *m*, H-11 $\beta$ ), 3,45 (1H, *dd*,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 12,0$  Hz,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 6,0$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 3,17 (1H, *dd*,  $J_{2\beta,3\alpha} = 12,0$  Hz,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 4,1$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 1,62, (3H, *s*, Me-30), 0,93 (3H, *s*), 0,90 (3H, *s*), 0,71 (9H, *s*), 0,70 (3H, *s*).

**3.2.1.3 Nepeticina [3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -lup-20(29)-ene-3,11-diol, 54]**

Agulhas incolores, p.f. 215 °C

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3460 (OH), 1640, 885 (C=CH<sub>2</sub>, isopropenilo).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, 442), 442 [M]<sup>+</sup> (20), 428 (14), 424 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (100), 409 [M-H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup> (34), 406 [M-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (47), 391 [M-2H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup> (35), 381 (17), 363 (16), 313 (12), 255 (37), 237 (45), 231 (32), 216 (61), 203 (55), 189 (69), 175 (53), 149 (62), 133 (63).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  4,71 (1H, *br s*, H-29a), 4,58 (1H, *br s*, H-29b), 3,94 (1H, *td*,  $J_{11\beta,9\alpha} = J_{11\beta,12\alpha} = 10,4$  Hz,  $J_{11\beta,12\beta} = 5,4$  Hz, H-11 $\beta$ ), 3,20 (1H, *t*,  $J_{2\beta,3\alpha} = J_{2\alpha,3\alpha} = 8,0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 2,38 (1H, *td*,  $J_{13\beta,12\alpha} = J_{13\beta,18\alpha} = 12,5$  Hz,  $J_{12\beta,13\beta} = 5,5$  Hz, H-13 $\beta$ ), 1,66, (3H, *s*, Me-30), 1,03 (6H, *s*), 0,98 (3H, *s*), 0,96 (3H, *s*), 0,79 (3H, *s*), 0,78 (3H, *s*).

**3.2.1.4 1 $\beta$ ,3 $\beta$ -lup-20(29)-ene-1,3-diol (55)**

Agulhas incolores, p.f. 249-251 °C

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3570 (OH), 1600, 886 (C=CH<sub>2</sub>, isopropenilo).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, 442), 442 [M]<sup>+</sup> (9), 424 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (24), 427 [M-Me]<sup>+</sup> (4), 257 (14), 229 (25), 219 (15), 189 (44), 121(61), 109 (60), 43 (100).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  4,51 (1H, *br s*, H-29a), 4,45 (1H, *br s*, H-29b), 3,36 (1H, *dd*,  $J_{1\alpha,2\beta} = 11,4$  Hz,  $J_{1\alpha,2\alpha} = 4,5$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 3,18 (1H, *dd*,  $J_{2\beta,3\alpha} = 12,0$  Hz,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 4,1$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 1,68, (3H, *s*, Me-30), 0,97 (3H, *s*), 0,87 (6H, *s*), 0,83 (3H, *s*), 0,72 (3H, *s*), 0,68 (3H, *s*).

**3.2.1.5 1 $\beta$ ,11 $\alpha$ -di-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (56)**

Pó amorfo, p.f. 234-237 °C

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3300 (OH), 1640, 895 (C=CH<sub>2</sub>, isopropenilo).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 456), 456 [M]<sup>+</sup> (0,9), 438 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (14), 423 [M-H<sub>2</sub>O-Me]<sup>+</sup> (50), 219 (100), 205 (85).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  4,73 (1H, *d*,  $J_{\text{H-29a,b}}$  = 1,8 Hz, H-29a), 4,60 (1H, *d*,  $J_{\text{H-29a,b}}$  = 1,8 Hz, H-29b), 4,08 (1H, *dd*,  $J_{1\alpha,2\alpha}$  = 1,5 Hz,  $J_{1\alpha,2\beta}$  = 8,6 Hz, H-1 $\alpha$ ), 3,88 (1H, *td*,  $J_{11\beta,12\beta}$  = 4,9 Hz,  $J_{11\beta,12\alpha}$  = 10,8 Hz, H-11 $\beta$ ), 3,02 (1H, *dd*,  $J_{1\alpha,2\beta}$  = 8,6 Hz,  $J_{2\alpha,2\beta}$  = 13,6 Hz, H-2 $\beta$ ), 2,40 (1H, *td*,  $J_{13\beta,12\beta}$  = 5,7 Hz,  $J_{13\beta,18}$  = 11 Hz, H-13 $\beta$ ), 2,21 (1H, *dd*,  $J_{1\alpha,2\alpha}$  = 1,7 Hz,  $J_{2\alpha,2\beta}$  = 13,6 Hz, H-2 $\alpha$ ), 2,02 (1H, *m*, H-12 $\beta$ ), 1,70 (3H, *s*, Me-30), 1,08 (3H, *s*), 1,06 (3H, *s*), 1,04 (3H, *s*), 1,00 (3H, *s*), 0,89 (3H, *s*), 0,79 (3H, *s*).



**3.2.1.6 Ácido ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-óico, 22)**

Pó amorfo, p.f. 289-292 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3416 (OH), 1694 (C=O), 1650 (C=C).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, 456), 456 [M<sup>+</sup>] (4), 411 [M-COOH]<sup>+</sup> (1), 248 (100), 207 (30), 203 [248-COOH]<sup>+</sup> (32), 189 [207-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (10).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz):  $\delta$  5,25 (1H, *m*, H-12), 3,24 (1H, *dd*,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 5,0$  Hz,  $J_{2\beta,3\alpha} = 10,0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 1,25 (6H, *s*), 1,08 (3H, *s*), 0,99 (3H, *s*), 0,94 (3H, *d*,  $J = 6,6$  Hz), 0,86 (3H, *d*,  $J = 6,6$  Hz), 0,78 (3H, *s*).

**Composto 22a**

Pó amorfo, p.f. 286-288 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3450 (OH), 1725 (C=O), 1645 (C=C).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>, 470), 411 [M- COOMe]<sup>+</sup> (4), 262 (76), 207 (24), 203 [262-COOH]<sup>+</sup> (100), 189 [207-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (32).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz):  $\delta$  5,20 (1H, *m*, H-12), 3,62 (3H, *s*, O-CH<sub>3</sub>), 3,14 (1H, *dd*,  $J_{2\alpha,3\alpha} = 5,7$  Hz,  $J_{2\beta,3\alpha} = 9,0$  Hz, H-3 $\alpha$ ), 1,18 (3H, *s*), 1,06 (3H, *s*), 0,91 (6H, *s*), 0,84 (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz), 0,78 (3H, *s*), 0,64 (3H, *d*,  $J = 6,0$  Hz).

### 3.2.1.7 Ácido sumaresinólico (ácido 3 $\beta$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-olean-12-en-28-óico, 57)

Pó amorfo, p.f. 298-299 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3508 (OH), 2944, 1605 (C=CH), 1731 (COOH).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>, 472), 472 [M]<sup>+</sup> (3), 454 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2), 426 [M-HCOH]<sup>+</sup> (1,8), 248 (100), 233 [248-Me]<sup>+</sup> (5,4), 224 (14), 203 [248-COOH]<sup>+</sup> (41), 189 [203-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (14), 149 (14), 133 (14).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  5,34 (1H, t,  $J$  = 3,0 Hz, H-12), 4,55 (1H, *br s*, H-6 $\alpha$ ), 3,15 (1H, *dd*,  $J_{2\alpha,3\alpha}$  = 4,7 Hz,  $J_{2\beta,3\alpha}$  = 8,1 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2,85 (1H, *dd*,  $J$  = 5,7 Hz,  $J$  = 12,0 Hz, H-18), 1,25 (3H, *s*), 1,17 (3H, *s*), 1,11 (6H, *s*), 1,08 (3H, *s*), 1,07 (3H, *s*), 0,90 (3H, *s*).

**3.2.1.8 Hederagenina (ácido 3 $\beta$ ,23-di-hidroxiolean-12-en-28-óico, 58)**

Pó amorfo, p.f. 334 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3508 (OH), 2932, 1604 (C=CH), 1730 (COOH).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>, 472), 472 [M]<sup>+</sup> (2,6), 454 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (1,4), 426 [M-HCOOH]<sup>+</sup> (2,4), 408 [M- HCOOH- H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (2), 248 (100), 233 [248-Me]<sup>+</sup> (7), 224 (14), 203 [248-COOH]<sup>+</sup> (54), 189 [203-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (18), 175 (16), 149 (30), 133 (25).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  5,21 (1H, *t*, H-12, *J* = 4 Hz), 3,65 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 3,57 (1H, *t*, *J* = 8 Hz, H-3a), 3,36 (1H, *d*, *J* = 10 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 2,85 (1H, *dd*, *J* = 5,7 Hz, *J* = 12,0 Hz, H-18), 1,06 (3H, *s*), 0,90 (6H, *s*), 0,89 (3H, *s*), 0,85 (3H, *s*), 0,83 (3H, *s*).

### 3.2.2 *A. vogelii*

#### 3.2.2.1 (2Z)-8-oxo-6,7,9,10-tetra-hidro-humul-2-en-12,1-olida (70)

Cristais incolores, p.f. 112-115<sup>0</sup>C

UV  $\lambda_{\text{máx.}}$  (EtOH) nm (log  $\epsilon$ ): 206 (3.032), 222 (3.252), 236 (3.507), 276 (3.934).

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 1750 ( $\gamma$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada), 1702 (cetona), 1370, 1326 (dimetilo geminal).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, 250), 250 [M]<sup>+</sup> (100), 235 [M-Me]<sup>+</sup> (2), 222 (4), 207 (3), 165 (22), 152 (40), 139 (28), 123 (30), 107 (12), 97 (43), 81 (9), 69 (39). HRMS  $m/z$ : 250.16138 (calculado para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz):  $\delta$  7,08 (1H, *s*, H-2), 4,55 (1H, *s*, H-1), 2,45-2,31 (4H, *m*, H-4 $\alpha$ , H-7, H-9 $\alpha$ , H-9 $\beta$ ), 2,18 (1H, *br t*,  $J_{4\beta,9} = 13,0$  Hz, H-4 $\beta$ ), 1,88-1,35 (6H, *m*, H-5 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-10 $\beta$ ), 1,21 (3H, *s*, Me-14), 1,11 (3H, *s*, Me-15), 1,03 (*d*, 3H,  $J_{7,13} = 7,0$  Hz, Me-13).

<sup>13</sup>C NMR: Tabela 15

**3.2.2.2 Asteriscunolida A (32)**

Cristais incolores, p.f. 165 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3000, 1750 (lactona), 1680 (cetona), 1630, 1380 (dimetilo geminal), 980, 900, 860, 840.

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 246), 246 [M]<sup>+</sup> (1), 203 (1), 201 (1), 185 (1), 173 (9), 150 (84), 135 (100), 107 (28), 91 (20).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  7,00 (1H, *s*, H-2), 6,15 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 13,8 Hz, H-9), 6,00 (1H, *m*, H-6), 5,29 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 13,8 Hz, H-10), 4,69 (1H, *s*, H-1), 2,8-2,2 (4H, *m*, H-4, H-5), 1,94 (3H, *s*, Me-13), 1,40 (3H, *s*, Me-14), 1,19 (3H, *s*, Me-14).

**3.2.2.3 Asteriscunolida C (34)**

Cristais incolores, p.f. 165 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2900, 1760 (lactona), 1650 (cetona), 1370 (dimetilo geminal), 900, 860.

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 246), 246 [M]<sup>+</sup> (5), 218 (2), 203 (3), 175 (4), 150 (100), 135 (68), 107 (57), 91 (36).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  6,96 (1H, *s*, H-2), 6,27 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 16,5 Hz, H-10), 5,91 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 16,5 Hz, H-9), 5,49 (1H, *br d*,  $J_{5\beta,6}$  = 12,9 Hz, H-6), 4,71 (1H, *s*, H-1), 2,5-2,3 (4H, *m*, H-4, H-5), 1,86 (3H, *s*, Me-13), 1,36 (3H, *s*, Me-14), 1,27 (3H, *s*, Me-15).

**3.2.2.4 Asteriscunolida D (35)**

Cristais incolores, p.f. 148 °C.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 3100, 1760 (lactona), 1660 (cetona), 1350 (dimetilo geminal), 980, 900, 870.

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, 246), 246 [M]<sup>+</sup> (6), 228 (2), 218 (2), 203 (1), 185 (1), 175 (2), 150 (96), 135 (75), 107 (100), 91 (34).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  7,03 (1H, *s*, H-2), 6,09 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 16,8 Hz, H-9), 5,72 (1H, *d*,  $J_{9,10}$  = 16,8 Hz, H-10), 5,51 (1H, *br d*,  $J_{5\beta,6}$  = 8,9 Hz, H-6), 4,76 (1H, *s*, H-1), 2,7-2,4 (4H, *m*, H-4, H-5), 1,76 (3H, *s*, Me-13), 1,28 (3H, *s*, Me-15), 1,23 (3H, *s*, Me-14).

**3.2.2.5 (2Z,6Z,9E)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (36a)**

Óleo incolor.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 1715 (éster), 1650 (cetona).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): ( $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , 262), 262  $[\text{M}]^+$  (14), 230  $[\text{M}-\text{MeOH}]^+$  (19), 203  $[\text{M}-\text{Me}-\text{CO}_2]^+$  (31), 150 (77), 135 (87), 107 (100), 96 (60).

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta$  6,67 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 16.4$  Hz, H-10), 5,88 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 16.4$  Hz, H-9), 5,85 (1H, *t*,  $J_{1,2} = 9.0$  Hz, H-2), 5,41 (1H, *m*, H-6), 3,76 (3H, *s*, O-Me), 2,62 (1H, *m*, H-1), 1,85 (3H, *s*, Me-13), 1,21 (6H, *s*, Me-14, Me-15).

$^{13}\text{C}$  NMR: Tabela 15



**3.2.2.6 (2Z,6E,9Z)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (37a)**

Óleo incolor.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 1710 (éster), 1640 (cetona).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, 262), 262 [M]<sup>+</sup> (2), 230 [M-MeOH]<sup>+</sup> (1), 203 [M-Me-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (1), 150 (100), 135 (90), 107 (19), 96 (5), 53 (13).

<sup>1</sup>H-NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 400 MHz, 80 °C):  $\delta$  6,20 (1H, *t*,  $J_{5\beta,6} = 7.0$  Hz, H-6), 5,89 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 13,4$  Hz, H-9), 5,59 (1H, *t*,  $J_{1,2} = 9$  Hz, H-2), 5,28 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 13,4$  Hz, H-10), 3,40 (3H, *s*, O-Me), 2,49 (1H, *m*, H-1), 2,33 (4H, *m*, H-4, H-5), 1,83 (3H, *s*, Me-13), 0,92 (6H, *s*, Me-14, Me-15).

<sup>13</sup>C NMR: Tabela 15

**3.2.2.7 (2Z,6E,9E)-8-Oxo-humula-2,6,9-trien-12-oato de metilo (38a)**

Óleo incolor.

IV  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 1710 (éster), 1660 (cetona).

EIMS  $m/z$  (int. rel.): ( $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , 262), 262  $[\text{M}]^+$  (16), 230  $[\text{M}-\text{MeOH}]^+$  (3), 203  $[\text{M}-\text{Me}-\text{CO}_2]^+$  (9), 150 (100), 135 (94), 107 (50), 96 (91).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 400 MHz, 57  $^\circ\text{C}$ ):  $\delta$  6,26 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 16,6$  Hz, H-10), 6,02 (1H, *d*,  $J_{9,10} = 16,6$  Hz, H-9), 5,59 (1H, *t*,  $J_{5\beta,6} = 6,5$  Hz, H-6), 5,52 (1H, *t*,  $J_{1,2} = 8,6$  Hz, H-2), 3,39 (3H, *s*, O-Me), 2,31-2,21 (4H, *m*, H-4, H-5) 1,82 (3H, *s*, Me-13), 0,97 (6H, *s*, Me-14, Me-15).

$^{13}\text{C}$  NMR: Tabela 15

**3.2.2.8 Dados de  $^{13}\text{C}$ -NMR dos compostos 70, 36a, 37a e 38a.****Tabela 15.** Dados de  $^{13}\text{C}$  NMR dos compostos **70, 33a, 37a e 38a** ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno, 250 MHz,  $\delta$  em ppm).

C	Composto			
	70	36a	37a	38a
<b>C-1</b>	87.1	40.3	41.7	42.9
<b>C-2</b>	147.5	141.7	142.9	141.3
<b>C-3</b>	134.3	137.3	139.1	138.9
<b>C-4</b>	25.2	33.4	34.6	35.2
<b>C-5</b>	23.5	31.2	25.4	25.3
<b>C-6</b>	32.0	129.4	150.4	148.2
<b>C-7</b>	44.9	130.9	129.8	132.7
<b>C-8</b>	213.5	205.7	201.1	203.9
<b>C-9</b>	35.0	127.0	128.2	127.2
<b>C-10</b>	28.4	161.0	143.7	160.1
<b>C-11</b>	38.2	37.2	40.6	37.3
<b>C-12</b>	173.5	168.5	165.7	167.7
<b>C-13</b>	18.5	21.2	11.0	11.9
<b>C-14</b>	23.8	29.7	29.7	29.6
<b>C-15</b>	29.4	29.7	25.4	29.6
<b>OMe</b>	-	51.4	51.1	51.3



#### **4. BIBLIOGRAFIA**



#### 4. BIBLIOGRAFIA

Abd-Elazem, I.; H. Chen, R. Bates e R. Huang (2002). Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza*. *Antiviral Research*, **55**, 91-106.

Abou-Jawdah, Y.; H. Sobh e A. Salameh (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 3208-3213.

Abutul, S.; A. Goldhirsh, O. Barazani, R. Ofir e D. Zilberg (2005). Screening of desert plants for use against bacterial pathogens in fish. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, **57**, 71-80.

Ahmad, V.; S. Bano, W. Voelter e W. Fuchs (1981). Chemical examination of *Nepeta hindostana* (roth) haines the structure of nepeticin. *Tetrahedron Letters*, **22**, 1715-1718.

Ahmad, V.; S. Bano, W. Voelter e W. Fuchs (1982). The structure of nepetidin a new triterpenoid from *Nepeta handistana*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **37b**, 1675-1676.

Ahmad, Z.; S. Mehmood, R. Ifzal, A. Malik, N. Afza, M. Ashraf e E. Jahan (2007). A new ursane-type triterpenoid from *Salvia santolinifolia*. *Turkish Journal of Chemistry*, **31**, 495-501.

Ahmed, A. (1992). Farnesol and thymol derivatives from *Asteriscus pygmaeus*. *Journal of Natural Products*, **55**, 824-827.

Aimi, N.; K. Likhitwitayawuid, J. Goto, D. Ponglux, J. Haginiwa e S. Sakai (1989). Triterpenoidal constituents of *Uncaria florida* Vidal. *Tetrahedron*, **45**, 4125-4134.

- Alim, A.; I. Goze, H. Goze e B. Tepe (2009). *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oils and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**, 413-419.
- Areias Grilo, P. (2009). *Doença de Alzheimer*. 1ª Ed. Coisas de Ler. Lisboa. Portugal.
- Askun, T.; K. Baser, G. Tumen e M. Kurkçuoğlu (2010). Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities. *Turkish Journal of Biology*, **34**, 89-95.
- Aydogmus, Z.; V. Yesilyurt e G. Topçu (2006). Constituents of *Salvia microphylla*. *Natural Product Research*, **20**, 775-781.
- Bergereon, R.J.; P. Cavanaugh, S. Kleine, R. Hughes, G. Elliot e C. Porter e C. Porter (1984). Antineoplastic and antiherpetic activity of spermidine catecholamine iron chelators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **121**, 848-854.
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1198-1200.
- Budzikiewicz, H.; J. Wilson e C. Djerassi (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of the American Chemical Society*, **85**, 3688-3699.
- Cao, Y.; L. Zang, C. Ma, B. Chang, Y. Chen, Y. Tang, X.D. Liu e X.Q. Liu (2009). Metabolism of protocatechuic acid influences fatty oxidation in rat heart: new anti-angina mechanism implication. *Biochemical Pharmacology*, **77**, 1096-1104.



Ceti, H.; I. Cinbilgel, A. Yanikoglu e M. Gokceoglu (2006). Larvicidal activity of some *Labiatae* plant extracts from Turkey. *Phytotherapy Research*, **20**, 1088-1090.

Coballase-Urrutia,E.; J. Pedraza-Chaverri, R. Camacho-Carranzad, N. Cárdenas-Rodríguez, B. Huerta-Gertrudisa, O. Medina-Camposc, M. Mendoza-Cruze, G. Delgado-Lamasf e J. Espinosa-Aguirred (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, **276**, 41-48.

Cuvelier, M.; C. Berset e H. Richard (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 665-669.

Dawidar, A.; S. Ayyad, M. Addel-Mogib e W. Alarif (2005). Humulene sesquiterpene lactones from *Asteriscus schimperi*. *Journal of Saudi Chemical Society*, **9**, 137-142.

Delira, R.; H. Parra-Delgado, M. Apan, N. Camacho e M. Martinez- Vazquez (2003). Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. *Revista de la Sociedad Quimica de Mexico*, **47**, 167–172.

Eidi, M.; A. Eidi e M. Bahar (2006). Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves in memory retention and its interaction with cholinergic systems in rats. *Nutrition*, **22**, 321-326.

El-Dahmy, S.; J. Jakupovic, F. Bohlmann e T. Sarg (1985). New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*, **41**, 309–316.

El-Hela, A; A. Abdullah (2010). Chemical composition and biological activities of essential oil of *Salvia acetabulosa* L. grown in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*, **6**, 690-695.

Ellman, G.; K. Courtney, V. Andres e R. Featherstone (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, **7**, 88-95.

El-Sayed, N.; W. El-Eraky, M. Ibrahim e T. Mabry (2006). Anti-inflammatory and ulcerogenic activities of *Salvia triloba* extracts. *Fitoterapia*, **77**, 333-335.

Exarchou, V.; N. Nenadis, M. Tsimidou, I. Gerothanassis, A. Troganis e D. Boskou (2002). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5294-5299.

Faircloth, G.; D. Stewart e J. Clement (1988). A simple screening procedure for quantitative measurement of cytotoxicity assay. *Journal of Tissue and Culture Methods*, **11**, 201-205.

Ferreira, A.; C. Proença, M. Serralheiro e M. Araújo (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**, 31-37.

Folin, O. e V. Ciocalteu (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **27**, 627-650.

Furuya, T.; Y. Oryhara e C. Hayashi (1987). Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells. *Phytochemistry*, **26**, 715-719.

Gao, D.; L. Han, L. Zhang, X. Fang e J. Wang (2009). Bioavailability of salvianolic acid B and effect on blood viscosities after oral administration of salvianolic acids in beagle dogs. *Archives of Pharmacal Research*, **32**, 773-779.

Halcon, L.; e K. Milkus (2004). *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *American Journal of Infection Control*, **32**, 402-408.

Hao, Y.; T. Xie e A. Korotcov (2009). Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways. *International Journal of Cancer*, **124**, 2200-2209.

Houghton, P.; Y. Ren e M. Howes (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Report*, **23**, 181-199.

Howes, M.; N. Perry e P. Houghton (2003). Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, **17**, 1-8.

Ikuta, A.; H. Itokawa (1986). Triterpenoids of *Akebia quinata* callus tissue. *Phytochemistry*, **25**, 1625-1628.

Imanshahidi, M.; H. Hosseinzadeh (2006). The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research*, **20**, 427-437.

Jakupovic, J.; L. Lehmann, F. Bohlmann e A. Hogdson (1987). Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. *Phytochemistry*, **26**, 2854-2855.

Janiksak, A.; G. Zupko, I. Manthe e J. Hohmann (2010). Comparative Studies of the antioxidant activities of eleven *Salvia* species. *Natural Products Communications*, **5**, 227-230.

Jedinak, A.; M. Muckova, D. Kostalova, T. Maliar e I. Masterova (2006). Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **61c**, 777-782.

John, T.; L. French e J. Erlichman (2006). The antinociceptive effect of Salvinorin A in mice. *European Journal of Pharmacology*, **545**, 129-133.

Kabouche, A.; N. Boutaghane, Z. Kabouche, E. Seguin, F. Tillequin e K. Benlabed (2005). Components and antibacterial activity of the roots of *Salvia jaminiana*. *Fitoterapia*, **76**, 450-452.

Kabouche, A.; Z. Kabouche, M. Öztürk, U. Kolak e G. Topçu (2007). Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*, **102**, 1281-1287.

Kaileh, M.; W. Berghe, E. Bone, T. Essawi e G. Haegeman (2007). Screening of indigeneous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and citotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**, 510-516.

Kalemba, D.; A. Kunicka (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 813-829.

Kamatou, G.; A. Viljoen e P. Steenkamp (2010). Antioxidant, anti-inflammatory activities end HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, **119**, 684-688.

Kamatou, G.; R. van Zyl, H. Davis, F. Heerden, a. Lourens e A. Viljoen (2008). Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *Salvia radula*. *South African Journal of Botany*, **74**, 238-243.

Kivrak, I.; M. Duru, M. Öztürk, N. Mercan e M. Harmandar (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, **116**, 470-479.

Kojima, H.; H. Tominaga, S. Sato e H. Ogura (1987). Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, **26**, 1107-1111.

Kolak, U.; I. Hacibekiroglu, M. Öztürk, F. Özgökçe, G. Topçu e A. Ulubelen (2009). Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia poculata*. *Turkish Journal of Chemistry*, **33**, 813-823.

Kolak, A.; Kabouche, M. Öztürk, Z. Kabouche, G. Topçu e A. Ulubelen (2009). Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochemical Analysis*, **20**, 320-327.

Kulisic-Bilicic, T.; V. Katalanic, V. Dragovic-Uzelac, I. Ljubenkov, A. Krisco, B. Dejanovic, M. Jukic, O. Politeo, G. Pifat e M. Milos (2008). Antioxidant and acetylcholinesterase inhibiting activity of several aqueous tea infusions *in vitro*. *Food Technology and Biotechnology*, **46**, 368-375.

Kuhlmann, A.; C. Roehl (2006). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* cultures of rosemary *Rosmarinus officinalis* and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, **44**, 401-410.

Kumari, A; S. Yadava, Y. Pakadeb, B. Singhc, S. Yadava (2010). Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetina. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **80**, 184 - 192.

Lacikova., L.; M. Abdel-Hamid, L. Novotny, I. Masterova e D. Grancai (2006). A Rapid tandem mass spectrometric assay for determination of ursolic acid – application to analysis of ursolic acid in four species of *Staphylea* L. and leaves of *Staphylea Pinnata* L. gathered during ontogenesis. *Chromatographia*, **63**, 117-122.

Lam, F.; J. Yeung, Y. Kwan, K. Chan e P. Or (2006). Salvianolic acid B, an aqueous component of danshen (*Salvia miltiorrhiza*), relaxes rat coronary artery by inhibition of calcium channels. *European Journal of Pharmacology*, **553**, 240-245.

Lamendin, H.; G. Toscano e P. Requirand (2004). Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires. *EMC-Dentisterie*, **1**, 179-192.

Lee, W.; L. Chiu e J. Yeung (2008). Cytotoxicity of major tanshinones isolated from danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on HepG2 cells in relation to glutathione perturbation. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 328-338.

Leelapornpisid, P.; S. Chansakao, T. Ittiwittayawat e S. Pruksakom (2005). Antimicrobial activity of herbal extracts on *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*. WOCMAP III: Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in Maps. *Acta Horticulturae*, **679**, 97-104.

Leipold, D.; G. Wünsch<sup>a</sup>, M. Schmidt<sup>b</sup>, H. Bart<sup>b</sup>, T. Bley<sup>c</sup>, H. E. Neuhaus<sup>d</sup>, H. Bergmanne<sup>e</sup>, E. Richlinge<sup>e</sup>, K. Muffler<sup>a</sup> e Roland Ulber<sup>a</sup> (2010). Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp. strains—Proposal of new biosynthetic pathway Process. *Biochemistry*, **45**, 1043–1051.

Lima, C.; P. Valentão, P. Andrade, R. Seabra, M. Ferreira e C. Pereira-Wilson (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, **167**, 107-115.

Liu, G.; T. Zhang, B. Wang e Y. Wang (1992). Protective action of seven natural phenolic against peroxidative damage to biomembranes. *Biochemical Pharmacology*, **43**, 147-152.

Liu, X.; R. Chen, Y. Shang, B. Jiao e C. Huang (2009). Superoxide radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of magnesium lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **4**, 663-668.

Loizzo, M.; F. Menichini, R. Tundis, M. Bonesi, F. Conforti, F. Nadjafi, A. Statti, N. Frega e F. Menichini (2009). *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Oleo Science*, **58**, 443-446.

Lu, Y.; L. Foo (2002). Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry*, **59**, 117-140.

Lugasi, A.; J. Hovari, K. Hagymasi, I. Jakoczi e A. Blazovics (2006). Antioxidant properties of a mixture of Lamiaceae plants intended to use as food additive. *Acta Alimentaria*, **35**, 85-97.

Mantle, D.; A. Pickering e E. Perry (2000). Medicinal plant extracts for the treatment of dementia. *CNS Drugs*, **13**, 201-213.

Matsingou, T.; N. Petrakis, M. Kapsokefalou e A. Salifoglou (2003). Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23**, 6696-6701.

Mauro, A.; R. Agabio, E. Bombardelli, I. Bourov, G. Gessa, C. Lobina, Paulo Morazzoni, M. Pani, R. Reali, G. Vacca e G. Colombo (2000). Potential use of medicinal plants in the treatment of alcoholism. *Fitoterapia*, **71**, S38-S42.

McClatchey, W.; G. Mahady, B. Bennet, L. Shiels e V. Savo (2009). Ethnobotany as a pharmacological research tool and recent developments in CNS-active natural products from ethnobotanical sources. *Pharmacology & Therapeutics*, **123**, 239-254.

Mendes, E.; F. Simões, M. C.de la Torre e B. Rodriguez (1993). Terpenoids from *Salvia sclareoides*. *Fitoterapia*, **64**, 89.

Miliauskas, G.; P. Venskutonis e T. van Beek (2004). Screening of radical scavenging activity of medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**, 231-237.

Miller, H., (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **48**, 91.

Miyazawa, M.; C. Yamafugi (2005). Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1765-1768.

Moretti, M.; A. Peana e M. Satta (1997). A study on anti-inflammatory and peripheral analgesic action of *Salvia sclarea* oil and its main components. *Journal of Essential oil Research*, **9**, 199-204.

Negrin, G.; J. Eiroa, M. Morales, J. Triana, J. Quintana e F. Estevez (2010). Naturally occurring Asteriscunolide A induces apoptosis and activation of mitogen – activated protein kinase pathway in human tumor cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, **49**, 488-499.

Newall, C.; L. Anderson e J. Philipson (1996). *Herbal Medicines: A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press. London. UK.

Nolkemper, S.; J. Reichling, F. Stintzing, R. Carle e P. Shniltzer (2006). Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against *Herpes simplex* virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Planta Medica*, **72**, 1378-1382.

Oboh, G.; T. Henle (2009). Antioxidant and inhibitory effects of aqueous extracts of *Salvia officinalis* leaves on pro-oxidant-induced lipid peroxidation in brain and liver *in vitro*. *Journal of Medicinal Food*, **1**, 77-84.



Orhan, I.; M. Aslan (2000). Appraisal of scopolamine-induced antiamnesic effect in mice and *in vitro* antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used *Lamiaceae* plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**, 327-332.

Orhan, I.; M. Kartal, Q. Naz, A. Ejaz, G. Yilmaz, Y. Kan, B. Konuklugil, B. Sene e M. Choudhary (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, **103**, 1247-1254.

Ota, M.; P. Houghton (2008). Boswellic acids with acetylcholinesterase inhibitory properties from frankincense. *Natural Products Communications*, **3**, 21-26.

Ozcan, B.; M. Esen, A. Coleri, H. Yolcu e M. Caliskan (2009). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of various extracts of *Salvia microstegia* (Boiss.) Et. Bal. from Antakya. *Fresenius Environmental Bulletin*, **18**, 658-662.

Özgen, U.; A. Mavi, Z. Terzi, A. Yuldurum, M. Coskun e P. Houghton (2006). Antioxidant properties of some medicinal *Lamiaceae* (*Labiatae*) species. *Pharmaceutical Biology*, **44**, 107-112.

Pavela, R., (2004). Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, **75**, 745-749.

Peraza-Sanchez, S.; N. Salazar-Aguilar e L. Pena-Rodriguez (1995). A new triterpene from the resin of *Busera simaruba*. *Journal of Natural Products*, **58**, 271-274.

Pereira, R.; T. Sumila, M. Furlan, A. Jorge e M. Uceno (2004). Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary infection. *Revista de Saúde Pública*, **38**, 326-328.

Perry, N.; P. Houghton, A. Theobald, P. Jenner e E. Perry (2000). *In vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 1347-1356.

Perry, N.; P. Houghton, J. Sampson, A. Theobald, S. Hart, M. Lis-Balchin, J. Hoult, P. Evans, P. Jenner, S. Milligan e E. Perry (2001). In vitro activity of *Salvia lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**, 1347-1356.

Pitarokill, D.; M. Couladis, N. Panayotarou e O. Tzakou (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 6688-6691.

Pitarokill, D.; O. Tzakou, A. Loukis e C. Harvala (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 3294-3301.

Pizzale, L.; R. Bortolomeazzi, S. Vichi, E. Uberegger e L. Conte (2002). Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *Salvia fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* e *Origanum indicendens*) extracts related to their phenolic compound contents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 1645-1651.

Plumb, J; R. Milroy e S. Kaye B (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research*, **49**, 4435-4440.

Prescott, L.; J. Harley e D. Klein (1996). *Microbiology*. 3<sup>th</sup> Ed. Wm. C. Brown Publishers. USA.

Proença da Cunha, A.; J. Ribeiro e O. Roque (2009). *Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações*. 2ª Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.

Qu, X.; X. Xia, Y. Wang, M. Song, L. Liu, Y. Xie, Y. Cheng, X. Liu, L. Qiu, L. Xiang, J. Gao, X- Zhang e S. Cui (2009). Protective effects of *Salvia plebeia* compound homoplantagin in on hepatocyte injury. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1710-175.

Ren, Y.; P. Houghton, R. Hyder e M. Howes (2004). Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Medica*, **70**, 201-204.

Reuter, J.; A. Jocher, S. Hornstein, J. Moenting e C. Schempp (2007). Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits-induced erythema *in vivo*. *Planta Medica*, **73**, 1190-1191.

Reys-Caudillo, E.; A. Tecante e M. Valdivia-Lopez (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, **107**, 656-663.

Rodrigues, J., (2006). Recolha dos 'saber-fazer' tradicionais das plantas aromáticas e medicinais. *Relatório de Projecto realizado no âmbito da execução do "Projecto Agir – para um mundo rural sustentável"* (Medida AGRIS, Acção 8 – Dinamização do Desenvolvimento Agro- Florestal e Rural).

Rueff, J.; A. Brás, L. Cristóvão, J. Mexia, M. Sá da Costa e V. Pires (1993). DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and <sup>60</sup>Co γ-radiation. *Mutation Research*, **289**, 197-204.

Ruzic, I., M. Serget e Z. Knez (2010). Potential of phenolic antioxidants. *Acta Chimica Slovenica*, **57**, 263-271.

Sakakibara, J.; T. Kaya e H. Fukuda (1984). Triterpenoids from *Enkianthus campanulatus*. *Phytochemistry*, **22**, 2553-2555.

Sakakibara, J.; T. Kaya, H. Fukuda e T. Ohki (1983). 6 $\beta$ -Hydroxyursolic acid and other triterpenoids from *Enkianthus campanulatus*. *Phytochemistry*, **33**, 627-630.

San Feliciano, A.; A. Barrero, M. Medarde, J. del Corral, E. Ledesma e F. Sanchez-Ferrando (1982). Asteriscunolide A: Humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. *Tetrahedron Letters*, **23**, 3097-3100.

San Feliciano, A.; A. Barrero, M. Medarde, J. del Corral, A. Aizpiri e F. Sanchez-Ferrando (1984). Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron*, **40**, 873-878.

San Feliciano, A.; A. Barrero, M. Medarde, J. del Corral, A. Aramburu, A. Perales, J. Fayos e F. Sanchez-Ferrando (1985a). The stereochemistry of asteriscunolides. An X-Ray based correction. *Tetrahedron*, **41**, 5711-5717.

San Feliciano, A.; A. Barrero, M. Medarde, J. del Corral, A. Aramburu, A. Perales e J. Fayos (1985b). Asteriscanolide. A sesquiterpene lactone with a new natural skeleton. *Tetrahedron Letters*, **26**, 2369-2372.

San Feliciano, A.; M. Medarde, J. del Corral, A. Aramburu, M. Gordaliza, e A. Barrero (1989). Aquatolide. A new type of humulane related sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Letters*, **30**, 2851-2854.

Sarg, T.; S. El-Dahmy, A. Ateya e H. Abdel-Fattah (1994). Two new bisabolone hydroperoxides and biological activity of *Asteriscus graveolens*. *Fitoterapia*, **65**, 241-244.

Sashida, Y.; O. Kazunori, N. Mori e T. Yamanouch (1992). Triterpenoids from the fruit galls of *Actinidia polygama*. *Phytochemistry*, **31**, 2801-2804.

Savelev, S.; E. Okello e E. Perry (2004). Butyryl and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, **18**, 315-324.

Savona, G.; M. Bruno, B. Rodriguez e J. Marco (1987). Triterpenoids from *Salvia deserta*. *Phytochemistry*, **26**, 3305-3308.

Schroeder, A.; R. Hughes e A. Bloch (1981). Synthesis and biological effects of acyclic pyrimidine nucleoside analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, **24**, 1078-1083.

Senol, F.; I. Orhan, F. Celep, A. Kahraman e M. Dogan (2010). Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, **120**, 34-43.

Singleton, V.; R. Orthofer e R. Ramuela-Raventos (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, **299**, 152-178.

Singh, S.; V. Tripathi e R. Singh (1990). 3 $\beta$ ,24-Dihydroxyolean-12-en-oic acid, a pentacyclic triterpeno acid from *Lantana indica*. *Phytochemistry*, **29**, 3360-3362.

Sokovic, M.; D. Brki, A. Dzamic, M. e P. Marin (2009). Chemical composition and antifungal activity of *Salvia desoleana* Atzei & Picci essential oil and its major components. *Flavour and Fragrance Journal*, **24**, 83-87.

Sousa, M.; M. Matos, M. Machado, R. Braz-Filho, I. Vencato e Y. Mascarenhas (1984). Triterpenoids from *Guettarda angelica*. *Phytochemistry*, **23**, 2589-2592.

Suhaj, M., (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 531-537.

Topçu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural Products*, **69**, 482-487.

Topçu, G.; Z. Turkmen, D. Kingston, J. Pezzuto e A. Ulubelen (2008). Cytotoxic activity of some Anatolian *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids. *Pharmaceutical Biology*, **46**, 180-184.

Topçu, G.; Z. Türkmen, A. Ulubelen, J. Shilling e D. Kingston (2004). Highly hydroxylated triterpenes from *Salvia kronenburgii*. *Journal of Natural Products*, **67**, 118-121.

Tosun, M.; S. Ercisli, M. Sengul, H. Ozer, T. Polat e E. Ozturk (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research*, **42**, 175-181.

Ulubelen, A., (2003). Cardioprotective and antibacterial terpenoids from *Salvia* species. *Phytochemistry*, **64**, 395-399.

Ulubelen, A.; G. Topçu (1992). Diterpenoids from *Salvia* species and their pharmacological activities. *Advanced Natural Product Chemistry*. Harwood Academic Publishers. USA.

Unal, E.; A. Mavi, A. Kara, A. Cakir, M. Sengul e A. Yildirim (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine. *Pharmaceutical Biology*, **46**, 207-224.

Wada, S.; A. Iida e R. Tanaka (2001). Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, **64**, 1545-1547.

Wang, F.; H. Hua, Y. Pei, D. Chen e Y. Jing (2006). Triterpenoids from the resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative effect and differentiation effects in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Natural Products*, **69**, 807-810.

Wang, M.; J. Li, M. Rangarajan, Y. Shao, E. LaVoie, T. Huang e C. Ho (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4869-4873.

Wang, X.; K. Bastow, C. Sun, Y. Lin, H. Yu, M. Don, T. Wu, S. Nakamura e K. Lee (2004). Antitumor agents. 239. Isolation, structure elucidation, total synthesis and anti-breast cancer activity of neo-tanshinlactone from *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **47**, 5816-5819.

Wang, Y.; D. Song, Z. Li, T. Yuan, H. Zhang, Y. Pei, Y. Jing e H. Hua (2009). Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*. *Phytochemistry Letters*, **2**, 81-84.

Weckesser, S.; K. Engel, B. Simon-Haarhaus, A. Wittmer, K. Pelz e C. Schempp (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, **14**, 508-516.

Weng, X.; W. Wang (2000). Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, **71**, 489-493.

Wu, B., T. Pan, Y. Leu, Y. Chang, P. Tai, K. Li e J. Horng (2007). Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (danshen) against enterovirus 71. *American Journal of Chinese Medicine*, **35**, 153-168.

Xavier, C., C. Lima, M. Ferreira e C. Wilson (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of

human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and Cancer*, **61**, 564-571.

Xia, Z., J. Gu, D. Ansley e J. Yu (2003). Antioxidant therapy with *Salvia miltiorrhiza* decreases plasma endothelin-1 and tromboxane B2 after cardiopulmonary bypass in patients with congenital disease. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **126**, 1404-1410.

Yokozawa, T.; J. Zhou, H. Oura, T. Tanaka, G. Nonaka e I. Nishioka (1995). Effects on blood pressure of caffeic acid analogs isolated from *Salviae miltiorrhizae* radix in rats with adenine-induced renal-hypertension. *Phytotherapy Research*, **9**, 105-109.

Young, F., W. Phungtamdet e B. Sanderson (2005). Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicology In Vitro*, **19**, 1051-1059.

Youssef, S.; Z. Ibraheim e A. Attia, (1995). Flavonoids from *Asteriscus pygmaeus* (DC.) Coss and DR grown in Egypt. *Bulletin of Pharmaceutical Science, Assiut University*, **18**, 33–38.

Zeng, Lu.; R. Zhang, D. Wang e Z. Lou (1990). Two triterpenoids from roots of *Glycyrrhiza yunnanensis*. *Phytochemistry*, **29**, 3605-3609.

Zheng, L.; S. Wang (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5165-5170.

Zhao, G.; H. Zang, T. Ye, Z. Xiang, Y. Yuan, Z. Guo e L. Zhao (2008). Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 73-81.



Zhou, Z.; Y. Zhang, X. Ding, S. Chen, J. Yang, X. Wang, G. Jia, H. Chen, X. Bo e S. Wang (2007). Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis virus replication both in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, **74**, 59-64.

Zhu, Y.; S. Huang, B. Tan, J. Sun, M. Whiteman e Y. Zhu (2004). Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Natural Product Reports*, **21**, 478-489.